

Expression, Charakterisierung und Optimierung mikrobieller Laccasen für die Biokatalyse

Von der Fakultät Energie-, Verfahrens- und Biotechnik der Universität Stuttgart zur
Erlangung der Würde eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von
Katja Koschorreck
aus Dresden

Hauptberichter: Prof. Dr. Rolf D. Schmid
Mitberichter: Prof. Dr. Georg Sprenger

Tag der mündlichen Prüfung: 15.12.2008

Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart

2008

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Stuttgart, 10.10.2008

(Katja Koschorreck)

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht.

Seite 52: Nachgedruckt mit freundlicher Genehmigung von Elsevier aus der Publikation “Comparative characterization of four laccases from *Trametes versicolor* concerning phenolic C–C coupling and oxidation of PAHs”. Koschorreck, K., S. M. Richter, A. Swierczek, U. Beifuss, R. D. Schmid und V. B. Urlacher. 2008. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 474: 213-219.

Seite 61: Nachgedruckt mit freundlicher Genehmigung von Springer aus der Publikation “Cloning and characterization of a new laccase from *Bacillus licheniformis* catalyzing dimerization of phenolic acids”. Koschorreck, K., S. M. Richter, A. B. Ene, E. Roduner, R. D. Schmid und V. B. Urlacher. 2008. *Applied Microbiology and Biotechnology* 79: 217-224.
Die Originalpublikation ist unter www.springerlink.com verfügbar.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Rolf D. Schmid gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des interessanten Themas, die Bereitstellung der hervorragenden Arbeitsbedingungen am Institut sowie die Betreuung meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Georg Sprenger danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich bei PD Dr. Vlada Urlacher für die Betreuung dieser Arbeit, ihre Unterstützung sowie die zahlreichen Anregungen und Diskussionen, die entscheidend zum Erfolg meiner Arbeit beigetragen haben.

Bei M. eng. Sven Richter möchte ich mich für seine Hilfe bei den Fermentationen und Proteinaufreinigungen sowie für seine Anregungen, sein Engagement im Projekt wie auch für die vielen fruchtbaren Diskussionen bedanken.

Von besonderem Wert waren für mich die Anregungen, Hilfestellungen und die Diskussionsbereitschaft von Dr. Michael Budde, Dr. Matthias Dietrich und Evelyne Weber, dafür vielen Dank.

Für das gute Arbeitsklima und die freundschaftliche Zusammenarbeit danke ich allen momentanen und ehemaligen Mitgliedern der Biokatalyse-Gruppe sowie allen Kollegen des Instituts für Technische Biochemie.

Mihaela-Anca Constantin und André Swierczek vom Fachgebiet Bioorganische Chemie der Universität Hohenheim und Augusta Ene vom Institut für Physikalische Chemie der Universität Stuttgart danke ich für die fruchtbare Zusammenarbeit im Rahmen des SFB 706 B4-Projektes.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Ministerium für Wissenschaft, Forschung und Kunst des Landes Baden-Württemberg danke ich für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 706 (Katalytische Selektivoxidationen von C-H-Bindungen mit molekularem Sauerstoff).

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
ZUSAMMENFASSUNG	9
ABSTRACT.....	11
1. EINLEITUNG	13
1.1. Laccasen	13
1.1.1. Vorkommen und Funktion	13
1.1.2. Struktur und Mechanismus.....	15
1.1.3. Eigenschaften	18
1.1.4. Das Laccase-Mediator-System.....	20
1.1.5. Produktion von Laccasen	23
1.1.6. Gezielte Veränderung von Laccasen.....	26
1.1.7. Industrielle Anwendung	27
1.2. Oxidative Phenolkupplung	29
1.2.1. Einleitung	29
1.2.2. Lignane.....	32
1.3. Ziele dieser Arbeit	34
2. ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	36
2.1. Vergleichende Charakterisierung von vier Laccasen aus <i>Trametes versicolor</i> hinsichtlich der Katalyse von phenolischen C–C-Kupplungen sowie der Oxidation von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen	36
2.2. Klonierung und Expression einer neuen Laccase aus <i>Bacillus licheniformis</i> zur Dimerisierung von phenolischen Säuren	41
2.3. Verbesserung der Expression und der katalytischen Aktivität einer bakteriellen Laccase durch Zufalls- und ortsgerichtete Mutagenese.....	45
3. PUBLIKATIONEN UND PUBLIKATIONSMANUSKRIPTE	51
3.1. Comparative characterization of four laccases from <i>Trametes versicolor</i> concerning phenolic C–C coupling and oxidation of PAHs.....	52

3.1.1. Supplementary material.....	59
3.2. Cloning and characterization of a new laccase from <i>Bacillus licheniformis</i> catalyzing dimerization of phenolic acids	61
3.2.1. Abstract	61
3.2.2. Introduction	62
3.2.3. Material and methods	63
3.2.4. Results	67
3.2.5. Discussion	70
3.2.6. References	77
3.3. Improving expression level and catalytic activity of a bacterial laccase by random and site-directed mutagenesis	80
3.3.1. Abstract	80
3.3.2. Introduction	81
3.3.3. Methods.....	82
3.3.4. Results	87
3.3.5. Discussion	90
3.3.6. Conclusions	91
3.3.7. References	98
4. SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK.....	103
5. LITERATURVERZEICHNIS.....	108

Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazolin-6-Schwefelsäure)
AOX	Alkoholoxidase aus <i>Pichia pastoris</i>
ATPase	Adenosintriphosphatase
<i>B. licheniformis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
bzw.	beziehungsweise
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
Cu	Kupfer
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E.C.	Enzymklasse
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESR	Elektronen-Spin-Resonanz
h	Stunde
HPLC	Flüssigchromatographie
GAL	Galaktokinase aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
GC/MS	Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie
IPTG	Isopropyl- β -D-thio-galaktopyranosid
K316N/D500G	CotA-Variante mit den Mutationen K316N und D500G
k_{cat}	Wechselzahl
kDa	Kilo Dalton
K_M	Michaelis Konstante
l	Liter
LB	Luria Bertani
LC/MS	Flüssigchromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie
mg	Milligramm
min	Minute

Abkürzungsverzeichnis

<i>o</i>	<i>ortho</i>
OD _{578 nm}	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 578 nm
<i>p</i>	<i>para</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
RNA	Ribonukleinsäure
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
TB	Terrific Broth
<i>T. versicolor</i>	<i>Trametes versicolor</i>
U	Unit (Stoffmengenumsatz in $\mu\text{mol min}^{-1}$)
UV	Ultraviolett
Vis	sichtbarer Bereich des Lichts

Zusammenfassung

Laccasen (E.C. 1.10.3.2.) gehören zu den Multikupferoxidasen und katalysieren die Ein-Elektron-Oxidation von vier Substratmolekülen durch die Vier-Elektronen-Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser. Die dabei gebildeten Substratradikale können entweder zu Dimeren, Oligomeren oder Polymeren reagieren oder werden von der Laccase weiter oxidiert. In der Natur treten Laccasen in Pilzen, Pflanzen, Bakterien und Insekten auf. Besonders aus Weißfäulepilzen wurden viele Laccasen beschrieben und in der Biokatalyse eingesetzt. Bisher wurden jedoch hauptsächlich natürlich vorkommende Mischungen von Laccasen aus Weißfäulepilzen und nicht isolierte Enzyme verwendet. In der vorliegenden Arbeit sollten deshalb Laccasen aus verschiedenen Mikroorganismen exprimiert und charakterisiert sowie auf ihre Einsetzbarkeit in der Biokatalyse untersucht werden. Die Aktivität der Laccasen bei der oxidativen Kupplung phenolischer Säuren sowie der Oxidation polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe stand dabei im Vordergrund. Die oxidative Kupplung phenolischer Säuren durch Laccasen kann die Herstellung von Naturstoffen wie Antioxidantien und Phytoöstrogenen ohne aufwendige chemische Synthese ermöglichen. Zudem sollte die häufig geringe Expression der Laccasen verbessert und gemeinsam mit der Aktivität der Enzyme über gezielte Mutagenese oder Zufallsmutagenese gesteigert werden.

Vier verschiedene Laccasen aus dem Weißfäulepilz *Trametes versicolor*, Lcc α , Lcc β , Lcc γ und Lcc δ , wurden erfolgreich in *Pichia pastoris* überexprimiert. Die Wahl der Signalsequenz zur Sekretion in *P. pastoris* sowie die Temperatur hatten einen großen Einfluss auf die Expression der Laccasen. Durch Hochzelldichte-Kultivierungen von *P. pastoris* wurden hohe Ausbeuten der Laccasen von bis zu 3400 U l⁻¹ erzielt, die den biotechnologischen Einsatz dieser Enzyme realisierbar machen. Die biochemische Charakterisierung der Laccasen ergab, dass Lcc α und Lcc β bei Raumtemperatur wie auch bei höheren Temperaturen deutlich stabiler als Lcc γ und Lcc δ waren. Zudem zeigten die Laccasen sehr unterschiedliche katalytische Aktivitäten. Obwohl alle vier Isoenzyme die oxidative Phenolkupplung von 5 mM Sinapinsäure regioselektiv zum Dehydrodisinapinsäuredilakton katalysierten, zeigte Lcc δ mit 98% Umsatz nach 20 min die höchste Aktivität. Lcc α , Lcc β und Lcc γ wiesen nach 20 min 34%, 50% bzw. 48% Umsatz auf. Die Oxidation polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe erfolgte hingegen am effektivsten mit Lcc β . Durch Einsatz des Redoxmediators 2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazolin-6-Schwefelsäure) (ABTS) wurde mit Lcc β nach 72 h über 80% Umsatz von 0,1 mM Anthracen, Acenaphthen und Acenaphthylen erzielt und damit

deutlich bessere Ergebnisse erreicht als bisher mit Laccase-Mischungen aus *T. versicolor* und ABTS. Lcc β wurde somit als stabilste Laccase aus *T. versicolor* mit hoher Aktivität gegenüber verschiedenen Substraten identifiziert und ist potenziell für einen Einsatz in der Biokatalyse geeignet. Strukturelle Analysen der Laccasen und anschließende Mutagenese zeigten, dass die unterschiedlichen Aktivitäten der Laccasen gegenüber polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen durch die Aminosäuren an Position 164 und 265 in der Substratbindetasche verursacht werden.

Des Weiteren wurde eine neue Laccase aus *Bacillus licheniformis* identifiziert und erfolgreich in *Escherichia coli* überexprimiert. Das Enzym CotA katalysierte die oxidative Kupplung verschiedener phenolischer Säuren, allerdings war die Aktivität des Enzyms stark von der Alkylkettenlänge der Säureseitengruppe wie auch von den Substituenten in *ortho*-Position der Phenolgruppe abhängig. So wurden 5 mM Sinapinsäure, Kaffeesäure und Ferulasäure von CotA nach 120 min zu 66%, 22% bzw. 15% umgesetzt, während *p*-Cumarsäure, Zimtsäure und Vanillinsäure nicht oxidiert wurden. Als Hauptprodukte der Kupplungsreaktionen wurden Dimere der Säuren identifiziert. Die höchste Regioselektivität bei der oxidativen Phenolkupplung wurde bei der Oxidation von Sinapinsäure zum Dehydrodisinapinsäuredilakton erreicht (79% Anteil am Gesamtprodukt). Syringasäure wurde von CotA ausschließlich zum 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinon oxidiert (22% Umsatz nach 120 min).

CotA wurde durch Zufallsmutagenese (error-prone PCR) verändert und 6000 CotA-Varianten im Hochdurchsatzverfahren auf verbesserte Aktivität gegenüber ABTS untersucht. Basierend auf den erzielten Ergebnissen wurde anschließend über einen rationalen Ansatz die CotA-Variante K316N/D500G erzeugt. Diese konnte 11,4-mal so stark wie der Wildtyp exprimiert werden. Das bedeutet, dass circa 300 mg aktive Laccase aus 1 l *E. coli*-Kultur erhalten werden können. K316N/D500G zeigte zudem eine um circa 50% höhere spezifische Aktivität bei der oxidativen Phenolkupplung von Ferulasäure als der Wildtyp. Die Aktivität gegenüber Kaffeesäure war leicht erhöht (20% Umsatz gegenüber 18% Umsatz mit CotA). Außerdem wurden die Farbstoffe Remazol Brilliant Blue R, Alizarin Red S und Indigocarmin von K316N/D500G sowohl in An- wie in Abwesenheit des Redoxmediators Violursäure deutlich stärker entfärbt als von CotA-Wildtyp. Die verbesserten Eigenschaften der CotA-Variante K316N/D500G ermöglichen den Einsatz dieser bakteriellen Laccase in der Biokatalyse. Die Charakterisierung der einzelnen CotA-Varianten K316N und D500G zeigte, dass sich die Mutation K316N zwar negativ auf die Stabilität von CotA auswirkte, jedoch die Aktivität des Enzyms gegenüber manchen Substraten erhöhte. Die Mutation D500G verringerte die Aktivität von CotA, führte aber zu einer starken Erhöhung der Expression der Laccase.

Abstract

Laccases (E.C. 1.10.3.2.) belong to the group of multicopper “blue” oxidases and catalyze the four-electron reduction of molecular oxygen to water by one-electron oxidation of four substrate molecules. The oxidized substrate radicals can either form dimers, oligomers or polymers or are further oxidized by the laccase. In nature laccases are widely distributed among fungi, plants, insects and bacteria. Especially from white-rot fungi many laccases have been described and used in synthesis and degradation reactions. In most cases, natural occurring mixtures of laccases from white-rot fungi, but not isolated enzymes have been applied so far. In this thesis, several laccases from different microorganisms were expressed and characterized and their applicability for biocatalysis was investigated. Thereby, the activity of the laccases in oxidative phenol coupling as well as in oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons was of special interest. Oxidative coupling of phenolic acids using laccases allows for the synthesis of natural products like antioxidants or phytoestrogens without extensive chemical synthesis. Low heterologous expression levels of laccases still hamper the biotechnological application of these enzymes. Thus, the expression of laccases should be optimized in this work as well. Additionally, the activity of laccases should be improved by rational protein design or random mutagenesis.

Four different laccases from the white-rot fungus *Trametes versicolor*, Lcc α , Lcc β , Lcc γ and Lcc δ , were successfully expressed in *Pichia pastoris*. The signal sequence for secretion in *P. pastoris* as well as the temperature had a major impact on the expression of the laccases in this host. High cell density fermentations of *P. pastoris* yielded volumetric activities of laccases of up to 3400 U l⁻¹. This provides the opportunity to use these enzymes for biotechnological applications. Biochemical characterization of the laccases showed, that Lcc α and Lcc β were much more stable than Lcc γ and Lcc δ at both room temperature and at elevated temperatures. Furthermore, the catalytic activities of the laccases were quite different. Although all four isoenzymes catalyzed the oxidative phenol coupling of 5 mM sinapic acid to dehydrodisinapic acid dilactone, Lcc δ showed the highest activity with 98% conversion after 20 min. Only 34%, 50% and 48% conversion have been reached with Lcc α , Lcc β and Lcc γ , respectively, after 20 min of reaction. The highest activity towards polycyclic aromatic hydrocarbons was obtained with Lcc β . In the presence of the redox mediator 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) over 80% conversion of 0.1 mM anthracene, acenaphthene and acenaphthylene was reached with Lcc β after 72 h.

Thus higher conversions have been achieved using the Lcc β -ABTS system compared to results described in the literature with laccase mixtures from *T. versicolor* and ABTS. From these results, Lcc β was identified as the most stable laccase of *T. versicolor* with a high activity towards various substrates and is potentially applicable in biocatalysis. Structural analysis of laccases followed by mutagenesis demonstrated the impact of positions 164 and 265 located at the substrate binding sites on activity of laccases towards polycyclic aromatic hydrocarbons.

Furthermore, a new laccase from *Bacillus licheniformis* was identified and successfully expressed in *Escherichia coli*. This enzyme referred to as CotA catalyzed the oxidative coupling of different phenolic acids. The activity of CotA strongly depends on the alkyl chain length of the acid side group and the substituting groups in *ortho*-position of the phenol group. CotA showed after 120 min of reaction 66%, 15% and 22% conversion of 5 mM sinapic acid, ferulic acid and caffeic acid, respectively, while *p*-coumaric acid, cinnamic acid and vanillic acid were not oxidized at all. The main products of the oxidative coupling reactions were identified as dimers of the phenolic acids. Highest regioselectivity during dimerization reactions was observed with sinapic acid as substrate. It was oxidized to dehydrodisinapic acid dilactone (79% of the total products). Syringic acid was oxidized by CotA exclusively to 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone (22% conversion after 120 min).

CotA was changed by random mutagenesis (error-prone PCR) and 6000 CotA variants were screened in a high-throughput system for increased activity towards ABTS. Based on the obtained results, the CotA-variant K316N/D500G was constructed using a rational approach. Expression level of this mutant was 11.4-fold higher than that of the wild type enzyme. Thus, approximately 300 mg of active laccase can be obtained from 1 l of *E. coli* culture. Furthermore, the specific activity of K316N/D500G in oxidative phenol coupling of ferulic acid was increased by 50% compared to CotA wild type. The specific activity towards caffeic acid was slightly increased (20% conversion compared to 18% conversion by CotA). Moreover, decolorization of the dyes remazol brilliant blue R, alizarin red S and indigo carmine by K316N/D500G was significantly higher both in the presence and absence of the redox mediator violuric acid as compared to the wild type. The improved properties of K316N/D500G allow for the application of this bacterial laccase in biocatalysis. Characterization of the CotA variants K316N and D500G showed that the mutation K316N negatively affected the stability of CotA, but led to an increase in enzyme activity towards some of the investigated substrates. The mutation D500G reduced the activity of CotA, but strongly improved expression of the laccase.

1. Einleitung

1.1. Laccasen

1.1.1. Vorkommen und Funktion

Laccasen (*p*-Benzendiol:Sauerstoff-Oxidoreduktasen; E.C. 1.10.3.2.) gehören zur Enzymklasse der Oxidoreduktasen. Sie katalysieren die Ein-Elektron-Oxidation von vier Substratmolekülen durch die Vier-Elektronen-Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser. Laccasen wurden bereits vor über 6000 Jahren in China zur Herstellung von Lack für das Kunsthandwerk eingesetzt (Huttermann et al. 2001). Dafür wurde der Saft des Lack-Baumes (*Rhus verniciflua*) verwendet, der große Mengen an Urushiol, einem Phenol, sowie eine Laccase enthält, die in Gegenwart von Sauerstoff Urushiol zu Lack polymerisiert (Huttermann et al. 2001). 1883 wurde dieses Enzym als erste Laccase aus dem Lack-Baum isoliert, woher diese Enzyme ihren Trivialnamen erhalten haben (Yoshida 1883). Zusammen mit den Enzymen Ascorbatoxidase (E.C. 1.10.3.3.) und Caeruloplasmin (E.C. 1.16.3.1.) werden Laccasen zur Gruppe der sogenannten „blauen Kupferproteine“ oder Multikupferoxidase zusammengefasst (Messerschmidt und Huber 1990, Reinhammar und Malstrom 1981).

Laccasen sind in der Natur weit verbreitet und treten vor allem in Pflanzen und Pilzen (Reinhammar und Malstrom 1981), aber auch in Insekten (Dittmer et al. 2004, Hoegger et al. 2006) und Bakterien (Claus 2003) auf. In Pflanzen sind Laccasen an der Ligninsynthese beteiligt (Omalley et al. 1993). Lignin (Abbildung 1) wird durch radikalische Polymerisation der Monolignole *p*-Cumarylalkohol, *E*-Koniferylalkohol und Sinapylalkohol aufgebaut (Adler 1977). Die Radikale werden dabei durch Oxidoreduktasen wie Peroxidasen und Laccasen erzeugt (Nose et al. 1995). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Laccasen an der Wundheilung von Pflanzen beteiligt sind, indem sie Urushiol zu Lack polymerisieren (Huttermann et al. 2001).

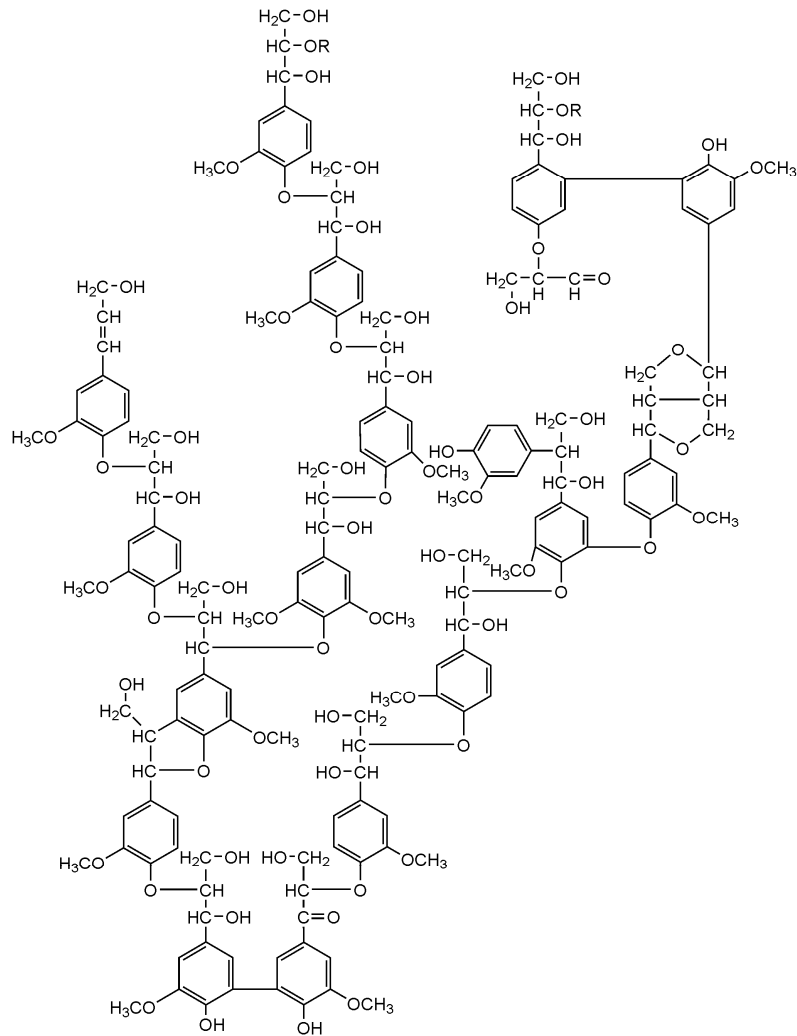


Abbildung 1: Struktur von Lignin. Verändert nach Adler et al. (Adler 1977).

Die Mehrzahl der bisher charakterisierten Laccasen stammt aus Pilzen, vor allem aus Basidiomyceten und Ascomyceten. Besonders viele Laccasen wurden bisher aus Weißfäulepilzen beschrieben (Bourbonnais und Paice 1990). Weißfäulepilze gehören zu den Basidiomyceten und bauen den Ligninanteil des Holzes mit Hilfe von Laccasen und Peroxidasen ab (Youn et al. 1995). Das hochpolymere Lignin dient den Laccasen aus Pilzen nicht selbst als Substrat, sondern wird vermutlich durch Radikale abgebaut, die durch die Laccasen erzeugt werden. Laccasen sind in Pilzen auch an der Pigmentbildung durch Polymerisation von Melaninvorstufen zu Melanin beteiligt (Clutterbuck 1972, Kurtz und Champe 1982). So wurde beispielsweise in *Aspergillus nidulans* die Grünfärbung der Konidien durch Deletion des Laccasegens γA verhindert (Clutterbuck 1972). Laccasen tragen in Pilzen außerdem zur Aushärtung des Zellverbandes von Fruchtkörpern (Leatham und Stahmann 1981) und zum Abbau von Huminsäuren bei (Chefetz et al. 1998, Scheel et al. 1999). Eine wichtige Rolle nehmen sie auch beim Befall von Pflanzen und der Abwehr von Bakterien ein (Geiger et al. 1986). Pflanzen bilden zur Abwehr von Schädlingen Abwehr-

stoffe wie Resveratrol und Tannine. Der Grauschimmel *Botrytis cinerea* sekretiert eine Laccase, die am Abbau dieser Pflanzenabwehrstoffe beteiligt ist und damit den Befall von Pflanzen ermöglicht (Schouten et al. 2008, Schouten et al. 2002). Der Weißfäulepilz *Pycnoporus cinnabarinus* oxidiert mit Hilfe von Laccasen 3-Hydroxyanthranilsäure zu Cinnabarinensäure, einem Abwehrstoff gegen Bakterien (Eggert 1997).

In Insekten sind Laccasen an der Bildung des Exoskeletts durch Sklerotisierung der Kutikula beteiligt (Sugumaran et al. 1992). Die Laccasen oxidieren dabei *N*-Acetylcatecholamine zu Chinonen und Chinonmethiden, die dann kutikuläre Proteine quervernetzen, was zur Erhärtung der Außenhaut führt (Arakane et al. 2005, Suderman et al. 2006).

Die physiologischen Funktionen von bakteriellen Laccasen sind bisher noch nicht vollständig aufgeklärt. Die thermostabile Laccase CotA aus *Bacillus subtilis* ist beispielsweise an der Melaninbildung in der Endosporenhülle beteiligt (Martins et al. 2002). Es wird allgemein angenommen, dass bakterielle Laccasen auch zur Sporenbildung und Morphogenese von Bakterien beitragen (Sharma et al. 2007). Außerdem spielen diese Enzyme eine wichtige Rolle bei der zellulären Entgiftung von Kupfer (Sharma et al. 2007). So transportiert beispielsweise in *Escherichia coli* die Cu(I)-transferierende P-Typ ATPase CopA, cytosolisches Cu(I) ins Periplasma, wo die Laccase CueO die Entgiftung von Cu(I) zu dem weniger toxischen Cu(II) katalysiert (Grass et al. 2004, Singh et al. 2004).

1.1.2. Struktur und Mechanismus

Laccasen besitzen ein komplex aufgebautes katalytisches Zentrum. Dieses besteht aus vier Kupferatomen, die aufgrund ihrer spektroskopischen Eigenschaften in Typ-1-, Typ-2- und Typ-3-Kupferzentren eingeteilt werden können (Messerschmidt und Huber 1990). Im Typ-1-Kupferzentrum ist ein Kupferatom über zwei Histidine, ein Cystein und einen vierten, weniger konservierten Liganden in axialer Position koordiniert. Bakterielle Laccasen besitzen Methionin als axialen Liganden, während Laccasen aus Pilzen Phenylalanin oder Leucin an dieser Position aufweisen (Claus 2004). Das Typ-1-Kupferatom wird durch seine starke Absorption bei 600 nm auch als „blaues Kupfer“ bezeichnet und kann über Elektronen-Spin-Resonanz (ESR)-Spektroskopie nachgewiesen werden. Wichtige Kenngrößen der ESR-Spektroskopie sind die Hyperfeinkopplungskonstante *A* und der *g*-Wert. Die Hyperfeinkopplungskonstante beschreibt die Wechselwirkung der Elektronenspins mit den benachbarten Kernspins. Der gemessene *g*-Wert spiegelt die Umgebung des Elektrons wieder, da er durch Spin-Bahn-Kopplung vom Wert des freien Elektrons abweicht. Das Typ-1-Kupferatom

von Laccasen weist typischerweise eine Hyperfeinkopplungskonstante von $43\text{-}95 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ und einen g -Wert von 2.19-2.30 auf (Solomon et al. 1996). Im Typ-2-Kupferzentrum in Laccasen ist das Kupferatom über zwei Histidine und ein Wassermolekül koordiniert. Auch das Typ-2-Kupfer zeigt ein charakteristisches ESR-Spektrum mit einer Hyperfeinkopplungskonstante von $170\text{-}193 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ und einem g -Wert von 2.22-2.26 (Solomon et al. 1996). Im Gegensatz zu den Typ-1- und Typ-2-Zentren besteht das Typ-3-Kupferzentrum aus zwei stark gekoppelten Kupferatomen, die jeweils über drei Histidine und ein gemeinsames Hydroxidion koordiniert sind. Das Typ-3-Kupferzentrum weist eine schwache Absorption im UV-Bereich bei 330 nm auf, ist allerdings durch die starke antiferromagnetische Kopplung der beiden Kupferatome über ESR-Spektroskopie nicht nachweisbar. Die Typ-2- und Typ-3-Kupferzentren werden auch als trinukleäres Typ-2/Typ-3-Kupfercluster bezeichnet, an welchem die Sauerstoffbindung und -reduktion erfolgt. Das Substrat wird am Typ-1-Kupferzentrum oxidiert, welches nachfolgend die Elektronen zum Typ-2/Typ-3-Kupfercluster weiterleitet. Analysen von Kristallstrukturen verschiedener Laccasen zeigen die Faltung dieser Proteine in drei verschiedene Cupredoxin-ähnliche Domänen A, B und C (Abbildung 2) (Bertrand et al. 2002, Enguita et al. 2003).

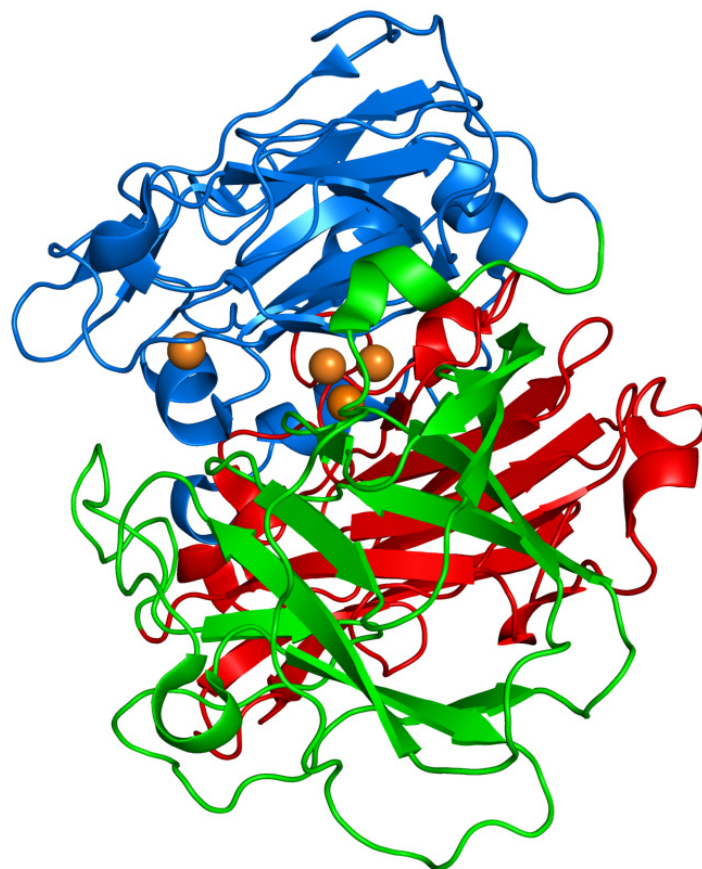


Abbildung 2: Dreidimensionale Struktur der Laccase TvL aus *Trametes versicolor* (PDB-Nummer 1GYC). Die Cupredoxin-ähnliche Domäne A ist rot, die Domäne B ist grün und die Domäne C ist blau dargestellt. Die vier Kupferatome sind orange gekennzeichnet.

Die Substratbindestelle befindet sich zwischen den Domänen B und C. Das Typ-1-Kupferzentrum liegt in der Domäne C und das Typ-2/Typ-3-Kupfercluster befindet sich zwischen den Domänen A und C. Die Cupredoxin-Faltung wurde auch in anderen Kupferenthaltenden Enzymen wie dem Ein-Kupfer-Protein Plastocyanin (Inoue et al. 1999) und den Multikupferoxidasen Ascorbatoxidase (Messerschmidt et al. 1992) und Caeruloplasmin (Zaitseva et al. 1996) nachgewiesen.

Der Mechanismus der Sauerstoffbindung und -reduktion in Multikupferoxidasen wurde intensiv untersucht. Solomon et al. schlugen den in Abbildung 3 dargestellten Reaktionsmechanismus vor (Solomon et al. 2001).

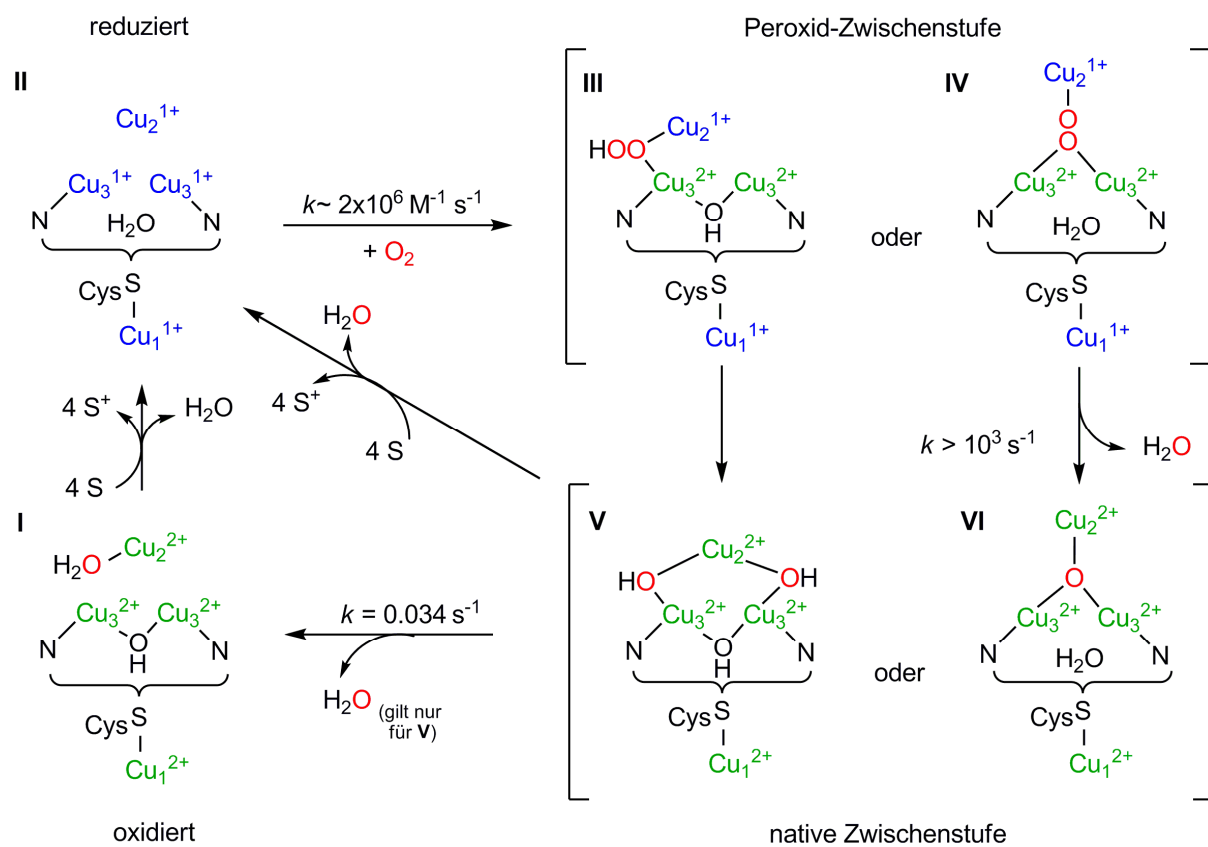


Abbildung 3: Mechanismus der Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser in Multikupferoxidasen. Cu_1 : Typ-1-Kupferatom, Cu_2 : Typ-2-Kupferatom, Cu_3 : Typ-3-Kupferatom. Die oxidierten Kupferatome sind grün dargestellt, die reduzierten Kupferatome sind blau dargestellt. Verändert nach Solomon et al. (Solomon et al. 2001).

Zuerst nimmt das Enzym, wie bereits erwähnt, durch Oxidation von vier Substratmolekülen vier Elektronen auf. Dabei geht das Enzym vom oxidierten (I) in den reduzierten Zustand (II) über. Das reduzierte Enzym überträgt zwei Elektronen auf Sauerstoff und bildet eine Peroxid-Zwischenstufe, wobei das Typ-3-Kupferzentrum oxidiert wird. In der Peroxid-Zwischenstufe verbrückt das Peroxid das oxidierte Typ-3-Kupferpaar mit dem reduzierten Typ-2-Kupfer-

atom. Solomon et al. beschreiben zwei mögliche Formen der Peroxid-Zwischenstufe. In der einen Form verbrückt das Peroxid als Hydroperoxid das Typ-2- mit einem Typ-3-Kupferatom (**III**). Die Typ-3-Kupferatome sind hier durch eine, auch im Ruhezustand vorhandene, Hydroxidbrücke verbunden. In der anderen Form verbrückt das Peroxid intern die Typ-2- und Typ-3-Kupferzentren (**IV**). Unabhängig vom Modell der Peroxid-Zwischenstufe wird diese in einem zweiten Zwei-Elektronen-Schritt reduziert, wobei das Typ-2- und Typ-1-Kupferzentrum unter Bildung der nativen Zwischenstufe oxidiert werden. Hierbei handelt es sich um ein Hydroxo- (**V**) oder Oxo-Produkt (**VI**). Das Enzym wird nun entweder schnell durch Oxidation neuer Substrate reduziert (**II**) oder geht in Substrat-Abwesenheit langsam in den Ruhezustand über (**I**). In diesem ist ein Sauerstoffatom in Form eines Wassermoleküls terminal an das Typ-2-Kupferzentrum gebunden.

1.1.3. Eigenschaften

Laccasen besitzen ein relativ breites Substratspektrum. Sie oxidieren verschiedene phenolische Verbindungen wie *o*- und *p*-Diphenole, Aminophenole, Polyphenole und methoxy-substituierte Phenole, aber auch nicht-phenolische Substanzen wie Polyamine, Arylamine sowie einige anorganische Verbindungen (Thurston 1994, Xu 1996, Xu et al. 1996). Bei der Oxidation phenolischer Substrate entstehen unter Freisetzung eines Protons Phenoxyradikale, die spontan zu Dimeren, Oligomeren oder Polymeren reagieren können oder niedermolekulare Abbauprodukte bilden. Somit umfassen von Laccasen katalysierte Reaktionen oxidative Kupplungen von Monomeren, wodurch C–C-, C–O- und C–N-Verbindungen geknüpft werden, den Abbau von Polymeren, als auch die Oxyfunktionalisierung und Ringspaltung von aromatischen Substanzen (Claus 2003).

Die phenolische Verbindung Syringaldazin sowie die nicht-phenolische Verbindung 2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazolin-6-Schwefelsäure) (ABTS) stellen typische Substrate von Laccasen dar. Die Oxidation dieser Stoffe durch ein Enzym in Anwesenheit von Sauerstoff identifiziert dieses Protein als eine Laccase (Bourbonnais und Paice 1990, Harkin und Obst 1973). Laccasen besitzen jedoch je nach ihrer Herkunft sehr unterschiedliche Eigenschaften. Sie liegen im Allgemeinen als Monomere vor, können aber auch als Dimere und Tetramere auftreten (Thurston 1994). Pflanzliche Laccasen sind glykosylierte Enzyme, die molekulare Massen im Bereich von 90-130 kDa aufweisen (Solomon et al. 1996). Laccasen aus Pilzen werden auch glykosyliert und in die Umgebung abgegeben, weisen jedoch molekulare Massen zwischen 60-80 kDa auf. Der Größenunterschied ist hauptsächlich

auf die stärkere Glykosylierung von pflanzlichen Laccasen (22-45%) gegenüber Pilzlaccasen (5-30%) zurückzuführen (Solomon et al. 1996, Xu et al. 2007). Die molekularen Massen bakterieller Laccasen liegen in der Regel zwischen 50-70 kDa. In *Streptomyces coelicolor* wurde allerdings auch die deutlich kleinere Laccase SLAC mit einer molekularen Masse von nur 32 kDa gefunden (Machczynski et al. 2004). Diese weist nur zwei der drei Cupredoxin-ähnlichen Domänen auf, die Domäne B ist nicht vorhanden. Somit repräsentiert SLAC eine neue Gruppe von Laccasen, die Zwei-Domänen-Laccasen. Bakterielle Laccasen können in freier Form intrazellulär vorliegen, wie beispielsweise eine Laccase in *Azospirillum lipoferum* (Diamantidis et al. 2000, Givaudan et al. 1993). Sie können aber auch mit der äußeren Endosporenhülle assoziiert sein, wie CotA aus *Bacillus subtilis* (Martins et al. 2002), oder im Periplasma vorliegen, wie CueO aus *Escherichia coli* (Grass und Rensing 2001).

Das pH-Optimum von Laccasen liegt zwischen pH 4,0 und 7,0 (Baldrian 2006). Es wurde aber auch eine alkalische Laccase mit einem pH-Optimum bei 9,0 beschrieben (Gouka et al. 2001). Mit phenolischen Substraten ergeben sich für Laccasen glockenförmige pH-Aktivitätsprofile. Diese resultieren daher, da mit steigendem pH-Wert das Redoxpotenzial von phenolischen Verbindungen abnimmt, wodurch diese leichter von der Laccase oxidiert werden. Im neutralen bis alkalischen pH-Bereich nimmt die Laccase-Aktivität jedoch durch die zunehmende Inhibierung durch Hydroxidionen wieder ab (Xu 1997). Für nicht-phenolische Substrate wie ABTS, die bei der Oxidation kein Proton freisetzen, ergeben sich im pH-Bereich von 4-9 monotone pH-Aktivitätsprofile.

Das Temperaturoptimum von Laccasen aus Pilzen liegt zwischen 30-60°C. Über 60°C werden diese Enzyme sehr schnell inaktiviert (Xu 1996). Bei bakteriellen Laccasen liegt das Temperaturoptimum bei etwa 80°C. Gleichzeitig ist die Thermostabilität dieser Enzyme deutlich höher als bei Laccasen aus Pilzen. Thermostabile bakterielle Laccasen aus *Bacillus subtilis*, mit einer Halbwertszeit von 112 min bei 80°C, und *Thermus thermophilus*, mit einer Halbwertszeit von über 14 h bei 80°C, wurden bereits beschrieben (Martins et al. 2002, Miyazaki 2005).

Die katalytische Aktivität der Laccasen hängt von verschiedenen Faktoren ab. Zum einen muss das Substrat im aktiven Zentrum gebunden werden, was bei Laccasen aus verschiedenen Organismen mit unterschiedlicher Effizienz erfolgen kann. Zum anderen spielt das Redoxpotenzial des Substrates und das der Laccase eine wesentliche Rolle. Je größer der Unterschied zwischen dem Redoxpotenzial von Laccase und Substrat ist, desto höher ist die Reaktionsrate (Xu 1996). Für Laccasen aus Pilzen wurden deutlich höhere katalytische

Aktivitäten als für bakterielle Laccasen beschrieben. So weisen Laccasen aus Pilzen Wechselzahlen im Bereich von 10^2 - 10^4 sec^{-1} auf, während für bakterielle Laccasen Wechselzahlen im Bereich von 10^1 - 10^2 sec^{-1} gefunden wurden (Baldrian 2006, Xu et al. 2007). Das Redoxpotenzial von Laccasen aus Pilzen liegt zwischen 400-800 mV, während bei bakteriellen Laccasen das Redoxpotenzial in der Regel zwischen 400-600 mV liegt (Xu et al. 2007). Das höhere Redoxpotenzial von Laccasen aus Pilzen könnte demzufolge für die höhere Reaktionsrate dieser Enzyme gegenüber bakteriellen Laccasen verantwortlich sein. Dem axialen Liganden des Typ-1-Kupferatoms wird eine große Bedeutung für die Höhe des Redoxpotenzials zugeschrieben (Xu et al. 1999). Laccasen aus Pilzen mit sehr hohem Redoxpotenzial tragen ein Phenylalanin als axialen Liganden, während Laccasen mit geringerem Redoxpotenzial, wie zum Beispiel bakterielle Laccasen, an dieser Position ein Methionin aufweisen (Claus 2004, Palmer et al. 1999, Xu et al. 1999). Experimentelle Untersuchungen haben gezeigt, dass der Austausch des axialen Liganden Methionin 502 in CotA aus *Bacillus subtilis* gegen Phenylalanin beziehungsweise Leucin das Redoxpotenzial des Enzyms um 100 mV erhöhte. Allerdings war die katalytische Aktivität des Enzyms drastisch reduziert (Duraó et al. 2006). Ein höheres Redoxpotenzial einer Laccase muss daher nicht immer mit einer höheren katalytischen Aktivität des Enzyms einhergehen. Die höheren Wechselzahlen von Laccasen aus Pilzen könnten demzufolge auch von einer besseren Substratbindung im aktiven Zentrum verursacht werden.

1.1.4. Das Laccase-Mediator-System

Die Verwendung eines Redoxmediators ermöglicht die Erweiterung des Substratspektrums von Laccasen auf Substrate, die entweder zu groß sind, um im aktiven Zentrum gebunden zu werden oder ein viel höheres Redoxpotenzial als die Laccasen selbst aufweisen. Redoxmediatoren sind niedermolekulare Verbindungen, die leicht von einer Laccase oxidiert werden, gute Elektronenüberträger sind, nach Oxidation durch Laccasen stabile Zwischenprodukte mit hohem Redoxpotenzial bilden und keine inhibierende Wirkung auf Laccasen haben sollten. Abbildung 4 zeigt ein vereinfachtes Schema der Oxidation eines Substrates im Laccase-Mediator-System (Bourbonnais et al. 1998).

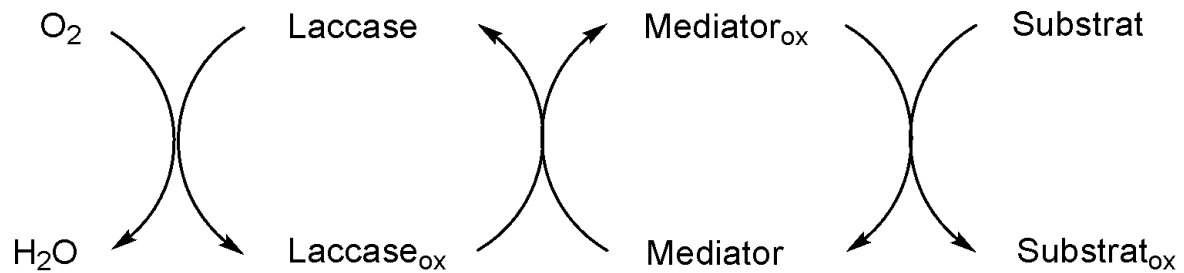


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Oxidation eines Substrates im Laccase-Mediator-System. Verändert nach Bourbonnais et al. (Bourbonnais et al. 1998).

Die Laccase oxidiert den Redoxmediator und überträgt die Elektronen auf molekularen Sauerstoff, der am aktiven Zentrum der Laccase zu Wasser reduziert wird. Der oxidierte Redoxmediator kann seinerseits das Substrat oxidieren, wobei der Redoxmediator wieder in den Ausgangszustand übergeht und damit erneut von der Laccase oxidiert werden kann. Der Redoxmediator wird hierbei auch als „diffusibler Elektronenüberträger“ bezeichnet, der große Moleküle mit hohem Redoxpotenzial Laccase-unabhängig oxidiert. Der genaue Mechanismus dieses Prozesses ist allerdings noch nicht vollständig verstanden. Potthast et al. gehen andererseits davon aus, dass durch die Oxidation des Redoxmediators das Redoxpotenzial der Laccase erhöht wird (Potthast et al. 1995). Dadurch kann diese Verbindungen oxidieren, die im aktiven Zentrum zwar gebunden werden können, deren Redoxpotenzial das der Laccase im Grundzustand aber übersteigt und somit nicht umgesetzt werden.

2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazolin-6-Schwefelsäure) (ABTS, Abbildung 5A) wurde als erster Redoxmediator zur Oxidation von nicht-phenolischen (veretherten) Ligninstrukturen eingesetzt, die von Laccasen allein nicht angegriffen werden können (Bourbonnais und Paice 1990). ABTS wird von Laccasen zuerst schnell zu einem stabilen grün-blauen $ABTS^{\bullet+}$ Kationradikal oxidiert, welches dann langsam zum rötlichen $ABTS^{2+}$ Dikation oxidiert wird (Bourbonnais et al. 1998). Das Kationradikal sowie das Dikation oxidieren Substrate wie Lignin durch Elektronentransfer, da Lignin zu groß ist, um im aktiven Zentrum von Laccasen gebunden werden zu können. Neben dem Abbau von Ligninstrukturen hat das Laccase-ABTS-System auch Anwendung in der Oxidation und Entgiftung der gesundheitsschädlichen polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (Han et al. 2004, Johannes et al. 1996, Johannes et al. 1998) sowie in der Entfärbung von Farbstoffen gefunden (Chhabra et al. 2008, Rodriguez Couto et al. 2005). Ein schwerwiegender Nachteil bei der Verwendung von ABTS zur Farbstoffbleiche ist allerdings die intensiv grün-blaue Farbe des Kationradikals, welche zu Verfärbungen führt.

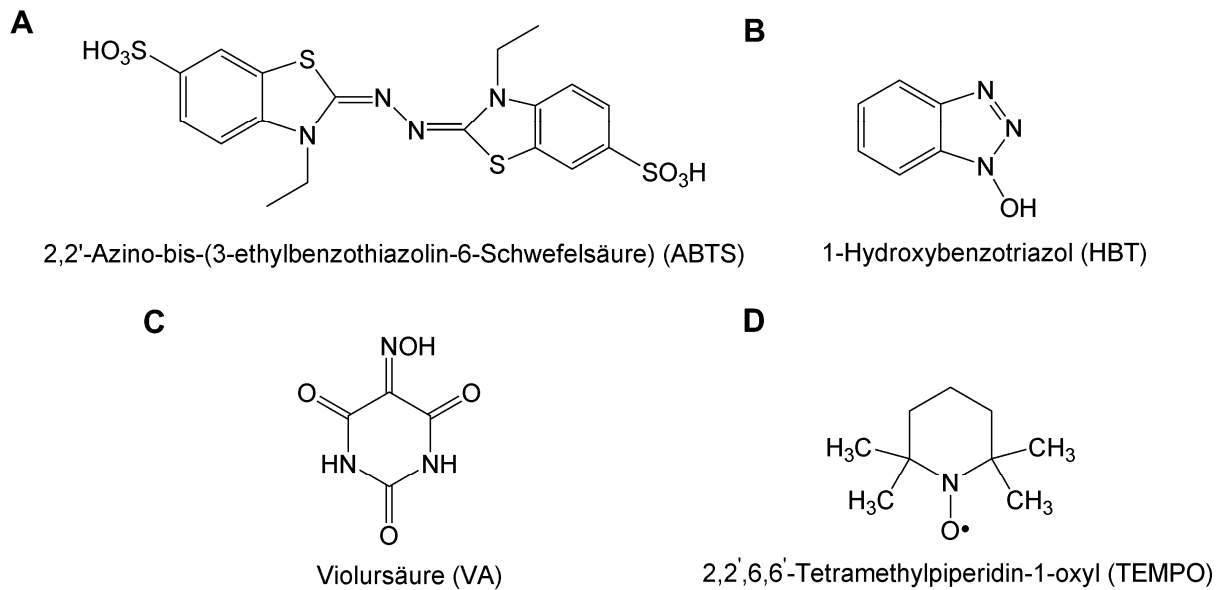


Abbildung 5: Strukturformeln verschiedener Redoxmediatoren. A) 2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazolin-6-Schwefelsäure) (ABTS), B) 1-Hydroxybenzotriazol (HBT), C) Violursäure (VA) und D) 2,2',6,6'-Tetramethylpiperidin-1-oxyl.

Neben ABTS gehört 1-Hydroxybenzotriazol (HBT, Abbildung 5B) zu den am intensivsten untersuchten Redoxmediatoren. Das Laccase-HBT-System wurde erfolgreich zur Oxidation von nicht-phenolischen Ligninstrukturen (Li et al. 1999) sowie zum Abbau von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen eingesetzt (Cambria et al. 2008). HBT ist allerdings im Gegensatz zu ABTS schwer wasserlöslich und kann zu einer starken Inhibierung von Laccasen führen (Li et al. 1999). Zudem wird HBT im Laccase-Mediator-System nicht zyklisch regeneriert wie beispielsweise ABTS, sondern relativ schnell irreversibel abgebaut (Morozova et al. 2007).

Wie ABTS und HBT wurde auch Violursäure (VA, Abbildung 5C) erfolgreich als Redoxmediator im Laccase-Mediator-System eingesetzt (Li et al. 1999, Soares et al. 2001). VA wird aber wie HBT nicht zyklisch regeneriert. VA und HBT gehören zur Gruppe der $>N-OH$ -Redoxmediatoren. Diese bilden nach Oxidation durch Laccasen unter Freisetzung eines Protons Nitroxylradikale ($>N-O\cdot$), welche Substrate mit hohem Redoxpotenzial durch Protonenabspaltung oxidieren können (Cantarella et al. 2003). Die gebildeten Nitroxylradikale sind instabil, weshalb das Laccase-VA/HBT-System nur eine begrenzte Zyklenzahl über aktiv ist. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei dem Redoxmediator 2,2',6,6'-Tetramethylpiperidin-1-oxyl (TEMPO, Abbildung 5D) um ein stabiles Nitroxylradikal, dass durch Laccasen zum Oxoammoniumion ($>N=O$), einem starken Oxidationsmittel, oxidiert wird. Dadurch können nicht-phenolische Substrate mit sehr hohem Redoxpotenzial umgesetzt

werden, wobei TEMPO zyklisch regeneriert wird. Das Laccase-TEMPO-System wurde erfolgreich zur Oxidation von primären Alkoholen (Fabbrini et al. 2002, Marjasvaara et al. 2004), zur Delignifizierung und zur Farbstoffbleiche eingesetzt (Xu et al. 2007).

Die hier beschriebenen Redoxmediatoren stellen beispielhaft die bisher am häufigsten verwendeten Redoxmediatoren im Laccase-Mediator-System dar. Prinzipiell kann jedoch jede Verbindung, die effektiv von einer Laccase oxidiert wird und gute elektronenübertragende Eigenschaften besitzt, als Redoxmediator eingesetzt werden.

1.1.5. Produktion von Laccasen

1.1.5.1. Produktion von Laccasen mit Wildstämmen

Wie bereits erwähnt, werden Laccasen von filamentösen Pilzen ins Medium sekretiert. Die höchsten Ausbeuten wurden dabei mit Weißfäulepilzen erzielt. Am häufigsten wurden bisher die Weißfäulepilze *Trametes versicolor*, *Trametes pubescens*, *Trametes hirsuta*, *Pycnoporus cinnabarinus* und *Pycnoporus ostreatus* zur Laccase-Produktion eingesetzt (Couto und Toca-Herrera 2007). Die Expression von Laccasen kann durch die Zugabe von Kupfer ins Medium erhöht werden, da Kupfer die Genexpression von Laccasen induziert (Collins und Dobson 1997, Palmieri et al. 2000). Durch Zugabe von natürlichen Laccase-Substraten oder strukturellen Analoga wie den phenolischen Substanzen 2,5-Xylidin, Ferulasäure oder Veratrylalkohol kann die Expression von Laccasen zusätzlich um ein Vielfaches gesteigert werden. Diese Substanzen führen ebenfalls direkt auf Genebene zur Induktion der Laccase-Expression (Collins und Dobson 1997). Allerdings handelt es sich bei diesen Induktoren häufig um toxische oder sehr teure Verbindungen. Eine umweltfreundliche und preiswertere Alternative stellt Ethanol als Induktor dar. Es wird vermutet, dass Ethanol direkt die Expression von Laccasen induziert oder deren Expression indirekt durch das Auslösen von oxidativem Stress einleitet (Lomascolo et al. 2003). Die höchsten Laccase-Ausbeuten wurden bisher bei der Kultivierung von *Pycnoporus cinnabarinus* im Schüttelkolben nach Induktion mit Ethanol mit 1000-1500 mg l⁻¹ (Lomascolo et al. 2003) und bei der Kultivierung von *Trametes pubescens* im Fermentationsmaßstab mit 700 mg l⁻¹ erzielt (Galhaup et al. 2002).

Die Kultivierung filamentöser Pilze im Bioreaktormaßstab und damit die Herstellung von Laccasen wird allerdings durch verschiedene Faktoren erschwert. Zum einen tritt bei hohen Zelldichten eine hohe Viskosität der Fermentationsbrühe auf, die die Durchmischung und Sauerstoffverteilung beeinträchtigt (Braun und Vecht-Lifshitz 1991). Zum anderen lagern sich

im Verlauf der Kultivierung Pilze an den Randbereichen des Fermenters an, die dann durch starke Hyphenbildung ebenfalls für eine schlechte Durchmischung und einen geringen Sauerstoffeintrag in die Randzonen sorgen. Ein weiterer Nachteil der Produktion von Laccasen mit Wildstämmen liegt in der Heterogenität der resultierenden Laccase-Lösung. Viele Pilze besitzen mehrere Laccasegene, die oft gleichzeitig exprimiert werden (Bertrand et al. 2002), so dass der Überstand einer Pilzkultur aus einem Gemisch verschiedener Laccase-Isoformen besteht. Die Isolierung der einzelnen Isoenzyme aus so einem Gemisch ist durch die ähnlichen molekularen Massen und pI-Werte der Laccasen eines Organismus sehr schwierig und äußerst aufwendig. Wird jedoch als Biokatalysator nicht ein einzelnes Isoenzym sondern ein Laccase-Gemisch verwendet, kann das die Produktausbeute mitunter deutlich herabsetzen. Zudem besteht die Möglichkeit unerwünschter Nebenreaktionen.

1.1.5.2. Heterologe Expression von Laccasen

Die heterologe Expression von Laccasen ermöglicht die separate Produktion von Laccase-Isoenzymen im Milligramm- bis Gramm-Maßstab. Da es sich bei Laccasen aus Pilzen um glykosylierte Proteine handelt, wurden verschiedene eukaryotische Expressionswirte für die heterologe Expression dieser Laccasegene untersucht. So wurden Laccasen aus Pilzen bisher erfolgreich in filamentösen Pilzen wie *Aspergillus niger* (Larrondo et al. 2003), *Aspergillus nidulans* (Larrondo et al. 2003), *Aspergillus oryzae* (Hoshida et al. 2005, Yaver et al. 1996) und *Trichoderma reesei* exprimiert (Saloheimo und Nikupaavola 1991). Eine Laccase aus *Melanocarpus albomyces* konnte dabei in *T. reesei* in einem Zulaufverfahren mit einer Proteinausbeute von 920 mg l⁻¹ produziert werden (Kiiskinen et al. 2004).

Die Expression von Laccasen wurde auch in verschiedenen Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae* (Bulter et al. 2003a, Necochea et al. 2005), *Pichia pastoris* (Jonsson et al. 1997, O'Callaghan et al. 2002), *Pichia methanolica* (Guo et al. 2005), *Kluyveromyces lactis* (Piscitelli et al. 2005) und *Yarrowia lipolytica* (Jolivald et al. 2005, Madzak et al. 2005a) erfolgreich durchgeführt. So konnten beispielsweise in *P. pastoris* 17 mg l⁻¹ einer Laccase aus *Trametes trogii* (Colao et al. 2006) und in *Y. lipolytica* 20 mg l⁻¹ einer Laccase aus *P. cinnabarinus* erhalten werden (Madzak et al. 2005b). *Escherichia coli* wurde bisher nur für die heterologe Expression bakterieller Laccasen verwendet (Grass und Rensing 2001, Machczynski et al. 2004, Martins et al. 2002, Miyazaki 2005). So konnten 30 mg l⁻¹ einer Laccase aus *Streptomyces lavendulae* durch Expression in *E. coli* erhalten werden (Suzuki et al. 2003). Die erfolgreiche Expression von eukaryotischen Laccasen in *E. coli* wurde noch nicht beschrieben.

Die heterologe Expression von Laccasen kann auf verschiedene Weise gesteigert werden. So wurde gezeigt, dass auch bei der heterologen Expression durch Zugabe von Kupfer die Ausbeute an Laccase deutlich erhöht wird (O'Callaghan et al. 2002). Vermutlich steht ohne Kupferzugabe nur ungenügend Kupfer für den Einbau in Laccasen zur Verfügung, da ein Teil auch in Wirtsproteine eingebaut wird. Da Kupfer jedoch toxisch für Zellen ist, kann es nur in beschränktem Maße zur Steigerung der Laccase-Ausbeute zugegeben werden.

Auch die Temperatur beeinflusst die Produktion von Laccasen. So konnte durch Herabsetzen der Temperatur während der Expression die Ausbeute verschiedener Laccasen in *P. pastoris*, *P. methanolica* sowie *K. lactis* deutlich gesteigert werden (Cassland und Jonsson 1999, Faraco et al. 2008, Guo et al. 2005).

Ein Problem bei der Expression von Proteinen in *P. pastoris* stellt das Absinken des pH-Wertes bis auf 3 im Verlauf der Expression dar (Ferrara et al. 2006). Bei diesem pH-Wert sind viele Proteine, wie zum Beispiel Laccasen, nicht stabil. Außerdem werden bei niedrigeren pH-Werten saure Proteasen aktiviert, die zum Abbau von heterolog exprimierten Proteinen führen können. Das Festsetzen des pH-Wertes auf pH 4 oder höher verbesserte demzufolge die Laccase-Produktion in *P. pastoris* wie *S. cerevisiae* durch die erhöhte Stabilität der Enzyme unter diesen Bedingungen (Jonsson et al. 1997, Larsson et al. 2001, Soden et al. 2002). Ferner konnte durch Verwendung eines Protease-defizienten *Pichia*-Stammes (*pep4*) die Ausbeute einer Laccase aus *T. versicolor* verdoppelt werden (Jonsson et al. 1997). Das *pep4*-Gen kodiert die vakuoläre Aspartylprotease Proteinase A, die für die Aktivierung anderer vakuolärer Proteasen wie der Carboxypeptidase Y und der Proteinase B benötigt wird. Durch Zellyse werden die Proteasen freigesetzt und führen so häufig zum Abbau heterolog exprimierter sekretierter Proteine. Der Überstand von Proteinase A-defizienten *Pichia*-Stämmen weist hingegen eine deutlich geringe proteolytische Aktivität auf, was die Ausbeute an heterolog exprimierten Proteinen erhöhen kann.

Um die Glykosylierung von eukaryotischen Laccasen im Expressionswirt zu erreichen, können diese Enzyme nicht intrazellulär exprimiert werden. Sie müssen über spezielle Sekretionssignale dem sekretorischen Weg zugeführt werden, in dessen Verlauf die Glykosylierung erfolgt. Die Wahl der Signalsequenz zur Sekretion spielt bei der Optimierung der Proteinexpression eine große Rolle. In *P. pastoris* war bisher die Verwendung der Signalsequenz des α -Faktor-Prepropeptides aus *S. cerevisiae* zur Sekretion von Fremdproteinen am erfolgreichsten (Cereghino und Cregg 2000). Diese Signalsequenz wird von dem *signal recognition particle* (SRP) in *P. pastoris* erkannt, welcher die wachsende Proteinkette dem sekretorischen Weg zuführt. Auch die natürliche Signalsequenz von Fremdproteinen wurde bereits erfolgreich zur Sekretion in *P. pastoris* eingesetzt, die Erfolge

waren aber unterschiedlich (Cereghino und Cregg 2000). Die Ausbeute von Laccasen aus *T. versicolor* konnte hingegen durch die Verwendung der natürlichen Signalsequenz der Laccasen anstelle der α -Faktor-Signalsequenz aus *S. cerevisiae* zur Sekretion in *P. pastoris* gesteigert werden (Jonsson et al. 1997, O'Callaghan et al. 2002).

1.1.6. Gezielte Veränderung von Laccasen

Die Expression einiger Laccasen aus Pilzen und Bakterien sowie deren Aktivität und Stabilität konnte anhand gentechnischer Methoden deutlich verbessert werden (Festa et al. 2008, Madzak et al. 2006, Zumarraga et al. 2008). Dabei wurden besonders Methoden des rationalen Protein-Designs aber auch der gerichteten Evolution verwendet. Beim rationalen Protein-Design werden strukturelle Informationen des Enzyms und Informationen über Enzym-Substrat-Wechselwirkungen genutzt, um ein Protein gezielt durch ortsgerichtete Mutagenese zu verändern. Die dazu erforderlichen Informationen können aus Kristallstrukturen, Homologiemodellen oder Sequenzvergleichen kommen. Ein großes Interesse lag und liegt bei Laccasen besonders auf der Identifizierung der Aminosäuren, die das Redoxpotenzial dieser Enzyme beeinflussen (Duraio et al. 2006, Xu et al. 1998, Xu et al. 1999). Durch gezielte Mutagenese wurde die Bedeutung des axialen Liganden des Typ-1-Kupferatoms für die Höhe des Redoxpotenzials von Laccasen nachgewiesen (Duraio et al. 2006, Palmer et al. 2003). Gleichzeitig hatten Veränderungen am axialen Liganden aber auch drastische Verminderungen der k_{cat} -Werte der Enzyme zur Folge (Duraio et al. 2006). Ein weiterer Schwerpunkt liegt auf der Steigerung der Aktivität der Laccasen durch Verbesserung der Substratbindung. Dies kann durch gezielte Veränderung der Aminosäuren, die an der Bindung von Substraten im aktiven Zentrum beteiligt sind, erreicht werden. Obwohl mittlerweile Kristallstrukturen von neun verschiedenen Laccasen aus Pilzen und von zwei bakteriellen Laccasen vorliegen, konnten bisher nur wenige Aminosäuren identifiziert werden, die für die Bindung von Substraten von Bedeutung sind. In Laccasen aus *T. versicolor* konnte hingegen die Bedeutung von Asparaginsäure an Position 206 für die Substratbindung gezeigt werden. Der Austausch von Asparaginsäure 206 gegen Alanin erhöhte die Aktivität der Laccase IIIb aus *T. versicolor*, während durch das Einführen von Asparagin das pH-Optimum des Enzyms deutlich verschoben wurde (Madzak et al. 2006).

Im Gegensatz zum rationalen Protein-Design wird bei der gerichteten Evolution eine große Anzahl an Enzymvarianten zum Beispiel durch Zufallsmutagenese erzeugt und anschließend mit geeigneten Testsystemen auf verbesserte Eigenschaften durchmustert. Die beste Variante

wird dann als Ausgangspunkt zur Erzeugung einer neuen Generation von Enzymvarianten verwendet. Der Prozess wird so lange wiederholt, bis eine Variante mit den gewünschten Eigenschaften erhalten wird. Der Vorteil der gerichteten Evolution besteht darin, dass keine strukturellen Informationen über das Protein vorliegen müssen. Außerdem können Positionen identifiziert werden, die nicht in unmittelbarer Nähe des aktiven Zentrums liegen, aber trotzdem für die Aktivität oder Stabilität des Enzyms von Bedeutung sind. Nachteilig ist, dass eine Vielzahl an Varianten erzeugt und durchmustert werden muss, da die meisten Mutationen zu keiner Verbesserung der Enzymaktivität führen. Die eingeführten Mutationen können einerseits still sein und somit die Proteineigenschaften nicht verändern oder sie können in Bereichen liegen, die keinen Einfluss auf die Aktivität oder Stabilität der Proteine haben. Mutationen in konservierten Bereichen führen hingegen oft zur Inaktivierung der Proteine. So können beispielsweise in Laccasen nur wenige Mutationen ohne Aktivitätsverlust eingeführt werden, da viele Bereiche hoch konserviert und funktionell essentiell sind (Festa et al. 2008). Die Wahl eines geeigneten Testsystems welches einfach, schnell, effektiv, reproduzierbar und hochdurchsatzfähig ist, entscheidet oft über den Erfolg der gerichteten Evolution. Zur Durchmusterung der Bibliotheken von Laccase-Varianten wurde bisher ABTS als Substrat verwendet (Alcalde et al. 2005, Festa et al. 2008). Die Oxidation von ABTS durch Laccasen zu einem grün-blauen Kationradikal kann photometrisch bei 420 nm gemessen werden und lässt sich einfach und schnell im Hochdurchsatzverfahren durchführen.

Bisher wurden nur Laccasen aus Pilzen durch gerichtete Evolution in ihren Eigenschaften verbessert. Die Expression dieser Enzyme erfolgte dabei in *S. cerevisiae*. Die hohe Transformationseffizienz von *S. cerevisiae* erlaubt im Gegensatz zu *P. pastoris* die Herstellung großer Mutantenbibliotheken. Durch gerichtete Evolution einer *Pleurotus ostreatus*-Laccase konnte eine Variante mit deutlich verbesserter spezifischer Aktivität und Stabilität erzeugt werden (Festa et al. 2008). Die gerichtete Evolution einer Laccase aus *Fomes lignosus* erhöhte hingegen deren Expression deutlich (Hu et al. 2007). Eine Laccase aus *Myceliophthora thermophila* konnte durch gerichtete Evolution in ihrer Aktivität (Zumarraga et al. 2008), Stabilität (Zumarraga et al. 2007) bzw. Expression signifikant verbessert werden (Bulter et al. 2003a).

1.1.7. Industrielle Anwendung

Aufgrund ihres breiten Substratspektrums und der Vielzahl der von ihnen katalysierten Reaktionen sind Laccasen für industrielle Anwendungen von Bedeutung. Momentan existieren zwei etablierte industrielle Prozesse, die auf Laccasen basieren (Xu et al. 2007).

Einer der Prozesse beruht auf der Laccase-katalysierten Entfärbung von Textilien. DeniLite[®] von Novozymes stellt die Kombination einer Laccase aus einem Pilz und dem Redoxmediator Methylsyringat dar. DeniLite[®] wird für die Bleiche von Indigo-gefärbten Jeans verwendet und ersetzt damit die deutlich umweltbelastendere Methode der Chlorbleiche. Beim zweiten industriellen Verfahren werden Laccasen zur Vermeidung des Korktons im Wein eingesetzt. Der Korkton wird vor allem durch 2,4,6-Trichloranisol hervorgerufen, eine Verbindung mit intensiv schimmelig-muffigem Geruch. Durch Waschen des Korkes mit Suberase[®]-Lösung werden natürlich vorhandene Phenole, die für den Korkton verantwortlich sind, polymerisiert und damit eliminiert.

Laccasen bieten aber noch eine Vielzahl weiterer Anwendungsmöglichkeiten. Sie können zum Beispiel in der Papierbleiche eingesetzt werden und damit die Chlorbleiche ablösen. So wird im Lignozym[®]-Verfahren Lignin, das die braune Farbe hervorruft, durch ein Laccase-Mediator-Gemisch abgebaut (Call 1992). Der Redoxmediator 1-Hydroxybenzotriazol ermöglicht den Abbau von Lignin, das zu groß ist, um für das aktive Zentrum von Laccasen zugänglich zu sein. Außerdem erfordern die veretherten Einheiten von Lignin ein Oxidationsmittel mit höherem Redoxpotenzial als das der Laccasen. Allerdings wird der industrielle Einsatz des Lignozym[®]-Verfahrens derzeit durch die hohen Mediatorkosten verhindert.

Laccasen können auch zur Reinigung des Abwassers von Schadstoffen bei der Papierherstellung oder der Farbstoffbleiche eingesetzt werden sowie zur Bodensanierung verunreinigter Böden (Gianfreda et al. 1999). Dabei werden auftretende Umweltgifte wie Chlorphenole durch Laccasen dehalogeniert, oligomerisiert oder beispielsweise mit Huminsäure kopolymerisiert, wodurch ihre Toxizität verringert wird (Xu et al. 2007). Karzinogene Schadstoffe wie polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe können ebenfalls durch Laccasen oxidiert und damit dem Abbau über Mikroorganismen zugeführt werden (Collins et al. 1996, Johannes und Majcherczyk 2000). Die Effizienz der Laccasen ist bei diesen Reaktionen häufig sehr gering, wenn keine Redoxmediatoren eingesetzt werden. Die hohen Mediatorkosten verhindern daher derzeit auch hier den Einsatz von Laccasen zum Schadstoffabbau.

In Biosensoren können Laccasen zur Detektion von chromophoren, chromogenen, fluorogenen, chemilumineszenten oder elektroaktiven Substanzen verwendet werden, deren Oxidation zum Beispiel optisch oder elektrisch gemessen werden kann (Xu et al. 2007). Bei amperometrischen Sensoren wird beispielsweise ein Elektrolysestrom an einer Arbeits-

elektrode gemessen, während ein zeitlich konstantes elektrochemisches Potenzial anliegt. Durch amperometrische Messung der Sauerstoffkonzentration kann beispielsweise die Anwesenheit eines Fremdstoffes ermittelt werden, da bei dessen Oxidation durch die Laccase der Sauerstoffgehalt in der Lösung abnimmt. Das oxidierte Substrat kann aber auch selbst an der Arbeitselektrode reduziert werden und somit einen Stromfluss hervorrufen. Laccase-basierte Sensoren wurden bisher zur Detektion von Phenolen in der Abfall- und Abwasserkontrolle sowie in der Qualitätskontrolle von Bier eingesetzt (EIKaoutit et al. 2008, Tang et al. 2008, Torrecilla et al. 2008).

Zweifellos stellt auch die organische Synthese von Wirkstoffen für die Medizin und Pharmazie einen wichtigen Anwendungsbereich von Laccasen dar. So wurde bereits gezeigt, dass Laccasen beispielsweise für die Neusynthese oder Modifikation von Antibiotika verwendet werden können (Xu et al. 2007). Die oxidative Kupplung von phenolischen Verbindungen wie phenolischen Säuren durch Laccasen kann andererseits die Synthese von Antioxidantien wie Resveratrol und Phytoöstrogenen wie Isoflavonen, Coumestanen und Lignanen ermöglichen (Leutbecher et al. 2005, Mustafa et al. 2005) (siehe Abschnitt 1.2.).

Die industrielle Anwendung von Laccasen erfordert deren effiziente Herstellung in großen Mengen sowie eine hohe spezifische Aktivität gegenüber den zu oxidierenden Substraten.

1.2. Oxidative Phenolkupplung

1.2.1. Einleitung

Die oxidative Phenolkupplung ist eine der ältesten Methoden der Aromatenkupplung (Pummerer et al. 1925). Damit können Phenole ohne vorherige Aktivierung verknüpft werden. Die Kupplung kann dabei zwischen zwei Molekülen (intermolekulare Phenolkupplung) oder innerhalb eines Moleküls erfolgen (intramolekulare Phenolkupplung). Die oxidative Phenolkupplung wird chemisch mit Hilfe von Metallverbindungen wie V(V), Fe(III), Cu(II), Ag(I) und Tl(III), nicht-metallischen Verbindungen wie Peroxiden und Iodverbindungen oder mit Hilfe von Sauerstoff in Verbindung mit Metallkatalysatoren durchgeführt (Whiting 1991, Wirth 2003, Wirth 2005, Yamamura 2003). Eine Schwierigkeit bei der chemischen Synthese liegt in der Kontrolle der Reaktivität und Regioselektivität. Abbildung 6 zeigt die Oxidation eines Phenols zum Phenoxyradikal und die verschiedenen Möglichkeiten der intermolekularen Radikalkupplung.

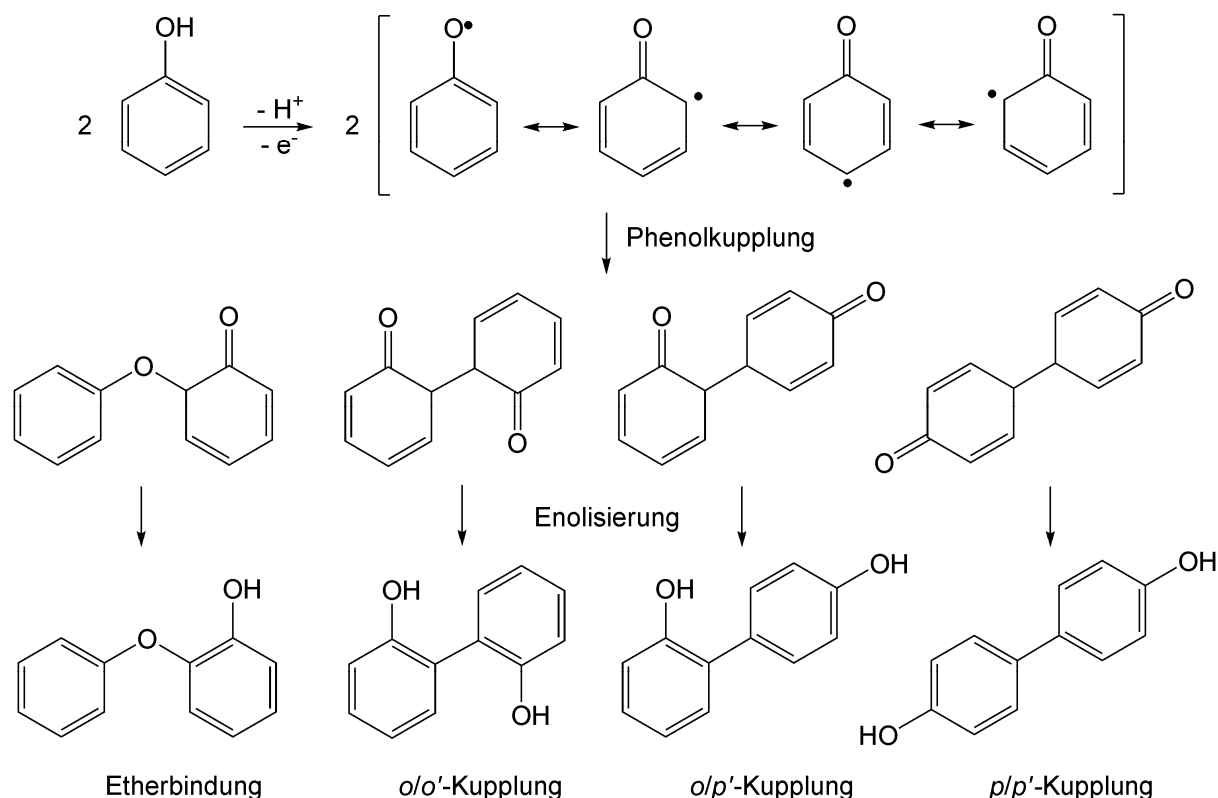


Abbildung 6: Oxidation eines Phenols zum Phenoxyradikal und anschließende Radikalkupplung. Durch intermolekulare Phenolkupplung zweier Radikale entstehen ohne Kontrolle der Selektivität Ether-, *o/o'*-, *o/p'*-, und *p/p'*-verknüpfte Ketotautomere. Durch Enolisierung werden sie in Enoltautomere umgewandelt.

Zuerst wird dem Phenol durch ein Oxidationsmittel ein Elektron und ein Proton entzogen. Die mesomeren Grenzstrukturen des Phenoxyradikals zeigen, dass die Kupplung mit einem zweiten Radikal bevorzugt in *ortho*- und *para*-Position erfolgt. Ohne Kontrolle der Selektivität ergeben sich daraus verschiedene Dimere, die *o/o'*-, *o/p'*- und *p/p'*-verknüpft, beziehungsweise durch eine Etherbindung verbunden sind (Abbildung 6). Da regioselektive intermolekulare Phenolkupplungen chemisch sehr schwierig sind, werden in der chemischen Synthese oxidative Phenolkupplungen häufig intramolekular durchgeführt, wodurch die Regioselektivität und gegebenenfalls auch Stereoselektivität vorgegeben wird (Abbildung 7).

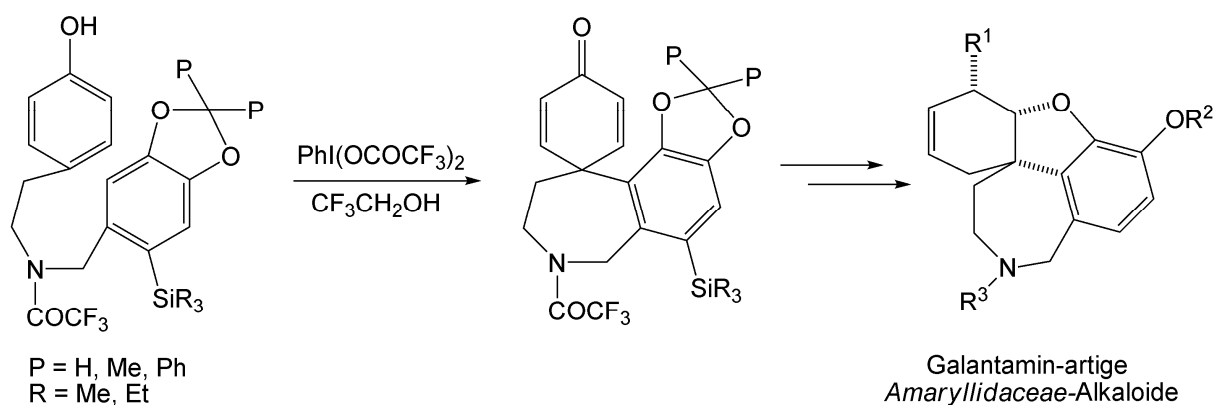


Abbildung 7: Intramolekulare oxidative Phenolkupplung. Mit Hilfe eines hypervalenten Iod(III)-Reagenz können Galantamin-artige *Amaryllidaceae*-Alkaloide chemisch über oxidative intramolekulare Phenolkupplung synthetisiert werden. Verändert nach Kita et al. (Kita et al. 1998).

In der Natur werden oxidative Phenolkupplungen vor allem von Pflanzen, Pilzen und Bakterien katalysiert. Hier treten die Reaktionen sowohl mit hoher Regio- als auch mit hoher Stereoselektivität auf. So werden viele Sekundärstoffe wie Lignane, Tannine, Alkaloide, Flavonoide, Cumarine, cyclische Peptide und Polyketidantibiotika über C–O- bzw. C–C-Kupplung gebildet (Erdtman 1933, Fujii et al. 1987, Woithe et al. 2007). Viele dieser Naturstoffe sind biologisch aktiv, weshalb ihre Herstellung für die Pharmaindustrie von großer Bedeutung ist. Da eine chemische Synthese oft sehr schwierig ist, liegt ein großes Interesse auf der Identifizierung und Bereitstellung der an der oxidativen Phenolkupplung beteiligten Enzyme.

Phenolkupplungen werden in der Natur von Oxidoreduktasen wie Peroxidasen, Laccasen, Tyrosinasen und Cytochrom P450-Enzymen katalysiert. Das Antibiotikum Geodin wird beispielsweise durch intramolekulare oxidative Phenolkupplung regio- und stereoselektiv gebildet (Fujii et al. 1987). So katalysiert die Dihydrogeodin-Oxidase, ein mit Laccasen verwandtes Enzym, in *Aspergillus terreus* die Kupplung von Dihydrogeodin zu (+)-Geodin (Abbildung 8A). In *Amycolatopsis orientalis* katalysieren die Cytochrom P450-Enzyme OxyA, OxyB und OxyC die intramolekularen Phenolkupplungsreaktionen während der Biosynthese von Vancomycin-artigen Glycopeptid-Antibiotika (Stegmann et al. 2006, Woithe et al. 2007). In *Lunaria annua* führt ein Cytochrom P450-Enzym die intramolekulare C–O- und C–C-Verknüpfung von N^1, N^{10} -Bis(*p*-cumaroyl)spermidin zu Lunarin durch (Abbildung 8B) (Sagner et al. 1998). Die Alkaloide Salutaridin und Berbamunin werden über intra- und intermolekulare Phenolkupplungen in Pflanzen gebildet. Regio- und stereoselektive, mikrosomale Cytochrom P450-Enzyme katalysieren dabei die Reaktionen (Zenk et al. 1989).

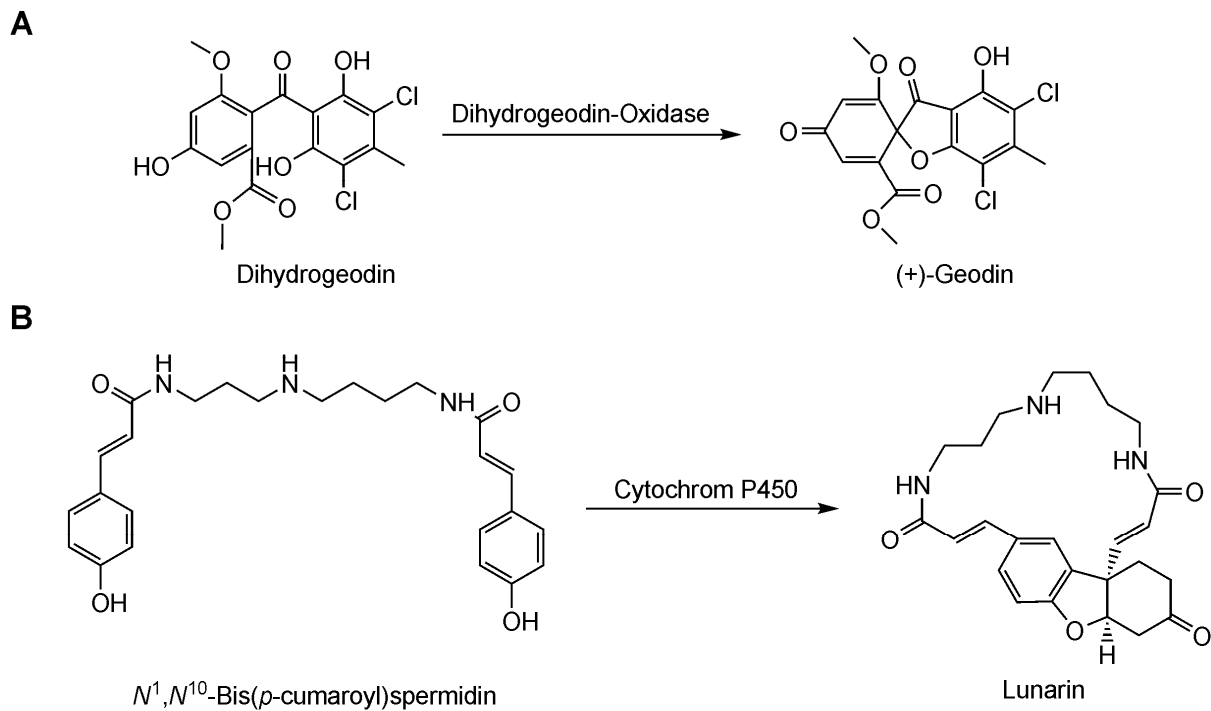


Abbildung 8: Intramolekulare Phenolkupplungen in der Natur. A) In *Aspergillus terreus* wird Dihydrogeodin durch die Dihydrogeodin-Oxidase über eine intramolekulare C–O-Verknüpfung zu (+)-Geodin umgewandelt (Fujii et al. 1987). B) In *Lunaria annua* katalysiert ein Cytochrom P450-Enzym die intramolekulare C–O- und C–C-Verknüpfung von N^1, N^{10} -Bis(*p*-cumaroyl)spermidin zu Lunarin (Sagner et al. 1998).

Aurofusarin ist ein Pigment, welches durch intermolekulare Phenolkupplung von dem Getreide-pathogenen Pilz *Fusarium graminearum* gebildet wird. Die Laccase Gip1 katalysiert dabei die Dimerisierung von Rubrofusarin zu Aurofusarin (Frandsen et al. 2006, Kim et al. 2005).

Während Cytochrom-P450-Enzyme neben intra- auch intermolekulare Phenolkupplungen stereoselektiv durchführen können (Zenk et al. 1989), wurden bisher keine stereoselektiven intermolekularen Reaktionen beobachtet, die auf Laccasen oder Peroxidasen allein zurückzuführen waren.

1.2.2. Lignane

Eine wichtige Rolle spielt die intermolekulare oxidative Phenolkupplung in der Natur auch bei der Biosynthese von Lignanenen (Abbildung 9). Dabei handelt es sich um pflanzliche Sekundärmetabolite, die aufgrund ihrer antikanzerogenen, antimittotischen, antiviralen und östrogenen Eigenschaften intensiv untersucht werden (Cordell und Farnsworth 1977, MacRae et al. 1989). Lignane bestehen aus zwei Propylbenzoleinheiten (C_6C_3), die 8,8'-verknüpft sind

(Moss 2000) und deren stereochemischer Aufbau eine chemische Synthese für den pharmazeutischen Einsatz sehr schwierig macht.

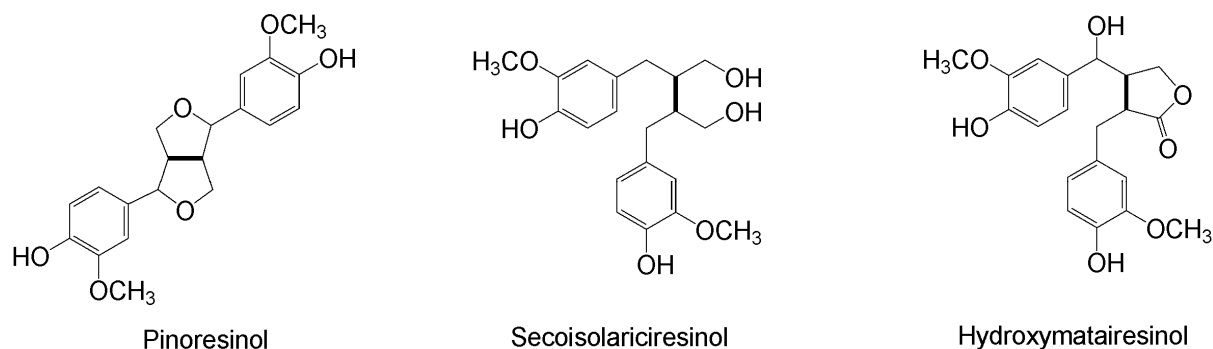
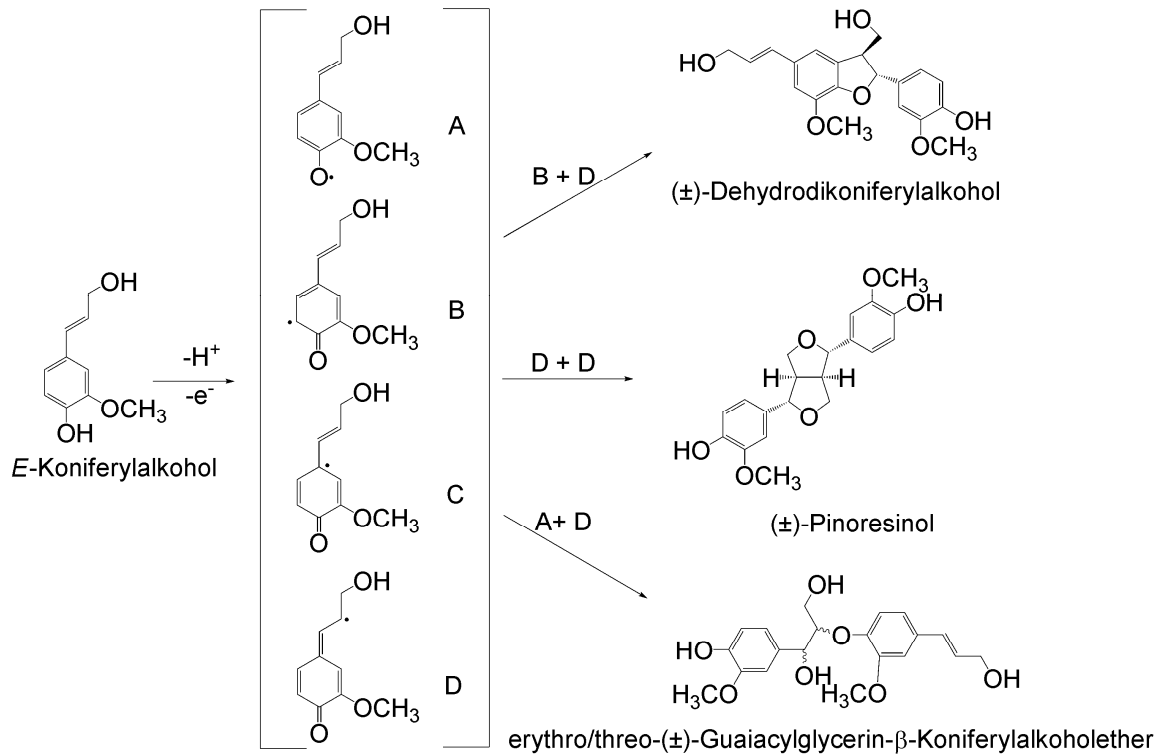


Abbildung 9: Strukturformeln verschiedener Lignane. Die 8,8'-Verknüpfung der Propylbenzoleinheiten der Lignane Pinoresinol, Secoisolariciresinol und Hydroxymatairesinol ist schwarz hervorgehoben.

Lignane werden durch oxidative Dimerisierung von Phenylpropenderivaten wie *E*-Koniferylalkohol, Ferulasäure und Isoeugenol gebildet (Erdtman 1933). Die für die Dimerisierung notwendigen Radikale werden dabei durch Laccasen und Peroxidasen erzeugt. Die Lignanbiosynthese findet in Pflanzen mit hoher Regio-, Stereo- und Enantioselektivität statt, wohingegen die oxidativen Phenolkupplungen die zu Lignin führen und ebenfalls von Laccasen und Peroxidasen katalysiert werden, nur sehr geringe Selektivitäten aufweisen. Die Kontrolle der Selektivität bei der Lignanbiosynthese wurde deshalb anhand der Synthese von (+)-Pinoresinol in *Forsythia intermedia* intensiv untersucht (Davin et al. 1997). Die *in vitro* Oxidation von *E*-Koniferylalkohol durch eine Laccase aus *F. intermedia* lieferte dabei racemisches Pinoresinol sowie regioisomere Produkte (Abbildung 10A). Davin et al. isolierten zusätzlich aus *F. intermedia* ein sogenanntes „dirigierendes Protein“, welches zusammen mit der Laccase aus *Forsythia* *E*-Koniferylalkohol selektiv zu (+)-Pinoresinol oxidierte (Abbildung 10B). Das dirigierende Protein weist selbst keine Oxidaseaktivität auf, sondern kontrolliert die selektive Kupplung der von der Laccase erzeugten Radikale. Kürzlich wurde in *Gossypium hirsutum* var. *marie-galante* ein dirigierendes Protein identifiziert, welches in Kombination mit einer Laccase aus *T. versicolor* Hemigossypol stereoselektiv zu (+)-Gossypol verknüpft (Liu et al. 2008).

In der Natur wird somit auch eine hohe Stereoselektivität bei intermolekularen oxidativen Phenolkupplungsreaktionen durch das Zusammenwirken von oxidierenden Enzymen wie Laccasen und dirigierenden Enzymen erreicht. Die Bereitstellung von Laccasen und dirigierenden Proteinen kann demzufolge *in vitro* die stereoselektive Synthese von Lignanen und anderen Naturstoffen für pharmazeutische Anwendungen ermöglichen.

A Racemische Kupplung



B Stereoselektive Kupplung

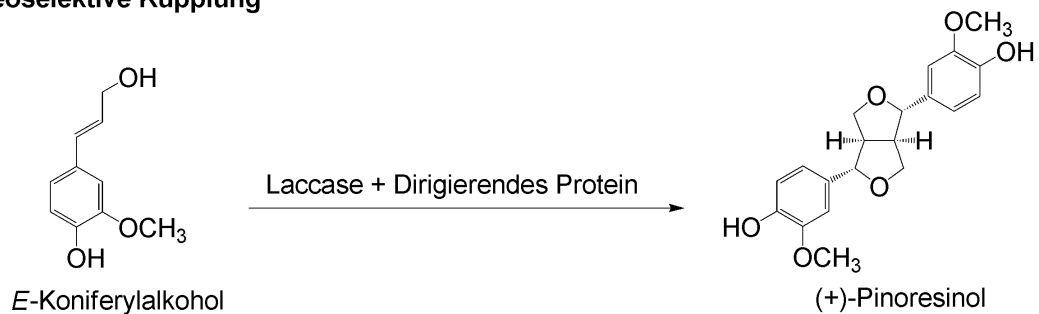


Abbildung 10: Oxidative intermolekulare Phenolkupplung von *E*-Koniferyllalkohol. A) Die Oxidation von *E*-Koniferyllalkohol durch eine isolierte Laccase aus *Forsythia intermedia* führt zu racemischen Dimeren. B) Durch den kombinierten Einsatz von einer Laccase und einem dirigierenden Protein aus *F. intermedia* wird *E*-Koniferyllalkohol nach Oxidation stereoselektiv zu (+)-Pinoresinol gekuppelt. Verändert nach Davin et al. (Davin et al. 1997).

1.3. Ziele dieser Arbeit

Laccasen bieten ein großes Potenzial für verschiedene biotechnologische Anwendungen. Bisher wurden in der Biokatalyse hauptsächlich natürlich vorkommende Mischungen von Laccasen aus Pilzen eingesetzt. Nur wenige isolierte Laccasen wurden bezüglich ihrer biochemischen Eigenschaften und katalytischen Aktivität charakterisiert und für Synthese- oder Abbaureaktionen verwendet. Für viele Anwendungen und besonders in der organischen

Synthese ist aber der Einsatz isolierter Enzyme von großer Bedeutung. Darüber hinaus sind Kenntnisse über die biochemischen Eigenschaften der Enzyme sowie über ihr Substratspektrum und ihre Aktivität gegenüber verschiedenen Verbindungen wichtig für die Optimierung von Reaktionen hin zu gesteigerten Produktausbeuten. In der vorliegenden Arbeit sollten deshalb Laccasen aus verschiedenen Mikroorganismen exprimiert, charakterisiert und ihre Verwendung für die Biokatalyse untersucht und optimiert werden. Von besonderem Interesse war dabei der Einsatz dieser Enzyme für oxidative Phenolkupplungen sowie die Oxidation von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen. Die Dimerisierung von phenolischen Säuren stellt einen möglichen Anwendungsbereich von Laccasen zur Synthese von Naturstoffen wie Antioxidantien und Phytoöstrogenen dar. Entsprechende Untersuchungen mit isolierten Laccasen wurden bisher nicht durchgeführt. Nach wie vor stellt die heterologe Expression von Laccasen in industriell relevanten Mengen eine große Herausforderung dar. Die Optimierung der Expression der Laccasen stand deshalb ebenfalls im Vordergrund dieser Arbeit.

In der vorliegenden Arbeit sollten die vier Laccasen des Weißfäulepilzes *Trametes versicolor* untersucht werden. Die Laccasen aus *T. versicolor* wurden bisher am häufigsten in Laccasekatalysierten Reaktionen eingesetzt. Dabei konnte gezeigt werden, dass diese Enzyme hohe Aktivität gegenüber biotechnologisch interessanten Substraten wie Farbstoffen und polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen aufweisen. Allerdings wurde auch hier nur eine natürlich vorkommende Mischung der Laccasen verwendet. Eine Charakterisierung der einzelnen Laccasen ist bisher nicht erfolgt. Die Laccasen aus *T. versicolor* sollten deshalb heterolog exprimiert und hinsichtlich ihrer biochemischen Eigenschaften verglichen werden. Weiterhin sollte ihre Expression optimiert werden. Die Einsetzbarkeit jeder einzelnen Laccase in der Biokatalyse sollte anhand der oxidativen Phenolkupplung von Sinapinsäure sowie der Oxidation verschiedener polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe bestimmt und optimiert werden.

Nur wenige bakterielle Laccasen wurden bisher kloniert und auf eine potenzielle biotechnologische Anwendbarkeit hin untersucht (Sharma et al. 2007, Xu et al. 2007). Durch Klonierung und Charakterisierung einer neuen Laccase sollte das Spektrum an bakteriellen Laccasen erweitert sowie untersucht werden, ob auch diese Enzyme in der Biokatalyse eingesetzt werden können. Ferner sollte die Expression und Aktivität der Laccase durch Zufallsmutagenese gesteigert werden.

2. Ergebnisse und Diskussion

2.1. Vergleichende Charakterisierung von vier Laccasen aus *Trametes versicolor* hinsichtlich der Katalyse von phenolischen C–C-Kupplungen sowie der Oxidation von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen

siehe auch Manuskript: “Comparative characterization of four laccases from *Trametes versicolor* concerning phenolic C–C coupling and oxidation of PAHs”, Seite 51 (Koschorreck et al. 2008b)

Laccasen aus dem Weißfäulepilz *Trametes versicolor* gehören zu den am häufigsten eingesetzten Laccasen und wurden zum Beispiel erfolgreich zur Oxidation polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe verwendet (Johannes und Majcherczyk 2000, Majcherczyk et al. 1998). Lacki und Duvnjak zeigten ferner, dass der Überstand einer *T. versicolor*-Kultur die oxidative Phenolkupplung von Sinapinsäure zum Dehydrodisinapinsäuredilakton katalysiert (Lacki und Duvnjak 1996, Lacki und Duvnjak 1998). Wie viele Pilze sekretiert *T. versicolor* jedoch nicht nur eine Laccase, sondern kann gleichzeitig mehrere Laccasen exprimieren. Mittlerweile wurden zehn Laccasen aus diesem Pilz beschrieben. Eine phylogenetische Analyse der veröffentlichten Laccase-Sequenzen ergab, dass diese in insgesamt vier verschiedene Isoenzymgruppen (Isoenzym- α , - β , - γ und - δ) eingeteilt werden können (Necochea et al. 2005). Innerhalb einer Gruppe beträgt die Sequenzidentität 97%, womit es sich höchstwahrscheinlich um allelische Variationen handelt. Bisher wurde nur ein Gemisch aus verschiedenen Laccase-Isoenzymen von *T. versicolor* und nicht einzelne Enzyme für Abbau- und Synthesereaktionen eingesetzt. Eine Charakterisierung der verschiedenen Laccasen aus *T. versicolor* bzw. ein Vergleich der katalytischen Aktivitäten der einzelnen Isoenzyme ist bisher ebenfalls nicht erfolgt. Um die biochemischen Eigenschaften der Laccasen aus *T. versicolor* zu untersuchen, wurde aus jeder Isoenzymgruppe eine Laccase kloniert und heterolog in *Pichia pastoris* exprimiert. Die Laccasen wurden charakterisiert und hinsichtlich der Katalyse der oxidativen Phenolkupplung von Sinapinsäure sowie der Oxidation verschiedener polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe untersucht.

Anhand der bereits veröffentlichten Laccase-Sequenzen *lcc1* (Necochea et al. 2005), *lcc2* (Cassland und Jonsson 1999), *CVLGI* (Mikuni und Morohoshi 1997) und *lcc1* (Jonsson et al. 1997) aus *T. versicolor* wurden spezifische Primer erzeugt, um aus *T. versicolor* jeweils ein Laccasegen aus den Isoenzymgruppen α , β , γ und δ zu klonieren. Aus einer Kultur von *T. versicolor* 3086 wurde dazu die Gesamt-RNA isoliert, die cDNA synthetisiert und daraus die Laccasegene *lcca*, *lcc β* , *lcc γ* und *lcc δ* amplifiziert. Die Gene wurden mit ihrer natürlichen Signalsequenz in den *S. cerevisiae*-Expressionsvektor pYES2 kloniert. *S. cerevisiae* ermöglicht die Optimierung von Proteineigenschaften durch gerichtete Evolution und wurde deshalb als Expressionswirt ausgewählt. Um den Einfluss der Signalsequenz auf die Sekretion der glykosylierten Enzyme zu untersuchen, wurde die natürliche Signalsequenz der Laccasen zusätzlich gegen die Signalsequenz des α -Faktor-Prepropeptides aus *S. cerevisiae* ausgetauscht und die erhaltenen Genkonstrukte ebenfalls in den pYES2-Vektor kloniert. Die Expression der Gene erfolgte unter Kontrolle des Galaktose-induzierbaren *GALI*-Promotors. Dieser kontrolliert in *S. cerevisiae* die Transkription des Galaktokinasegens *gal1* und wird bei Anwesenheit von Glukose reprimiert. Die Ausbeuten der Laccasen in *S. cerevisiae* waren allerdings zu gering für eine anschließende Charakterisierung der Enzyme wie auch für die Verwendung von *S. cerevisiae* als Expressionswirt für eine Optimierung der Laccasen durch gerichtete Evolution. In *E. coli* konnten die Laccasen nicht exprimiert werden. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass in *E. coli* keine Glykosylierung von Proteinen stattfindet. Die Glykosylierung von Laccasen könnte jedoch für die korrekte Faltung der Proteine essentiell sein. Entsprechende Untersuchungen gibt es bisher aber nicht.

Da *P. pastoris* bekannt ist für hohe heterologe Proteinexpressionen, wurden die Laccasegene in den *Pichia*-Expressionsvektor pPICZA unter Kontrolle des Methanol-induzierbaren *AOX1*-Promotors kloniert. Die Plasmide wurden nachfolgend in das Genom von *P. pastoris* stabil integriert. Als methylotrophe Hefe kann *P. pastoris* auf Methanol als einziger Kohlenstoff-Quelle wachsen. Methanol wird dabei durch die AOX1-Oxidase, die unter Kontrolle des starken *AOX1*-Promotors steht, zu Formaldehyd oxidiert. Die Expression der AOX1-Oxidase wird durch Zugabe von Methanol induziert, aber in Anwesenheit von Glukose reprimiert. Der Einfluss der Signalsequenz wie auch der Temperatur auf die Expression und Sekretion der Laccasen wurde in Minimalmedium mit 0,3 mM CuSO₄ untersucht. Bei dieser Kupferkonzentration wurden die höchsten Ausbeuten an Laccasen in *P. pastoris* erhalten. Die Temperatur während der Expression wurde zwischen 17°C und 30°C variiert. Sowohl die Wahl der Signalsequenz wie auch die Temperatur beeinflussten die Ausbeuten an aktiver Laccase, wie in der Literatur beschrieben (Cassland und Jonsson 1999, O'Callaghan et al. 2002). Die volumetrischen Aktivitäten der Laccasen wurden mit ABTS als Substrat bestimmt.

Für Lcc α wurde die höchste volumetrische Aktivität bei 25°C und der α -Faktor-Signalsequenz als Sekretionssignal erreicht (42 U l⁻¹), wohingegen für Lcc β die höchste volumetrische Aktivität mit der natürlichen Signalsequenz der Laccase und einer Expression bei 25°C erzielt wurde (105 U l⁻¹). Durch Herabsetzen der Expressionstemperatur auf 18°C konnte die Ausbeute an Lcc γ und Lcc δ in *P. pastoris* merklich verbessert werden. Mit der natürlichen Signalsequenz als Sekretionssignal wurde für Lcc γ bei 18°C eine volumetrische Aktivität von 6 U l⁻¹ erzielt, während für Lcc δ mit der α -Faktor-Signalsequenz 24 U l⁻¹ erreicht wurden. Die Verwendung des Proteinase A-defizienten *P. pastoris*-Stammes SMD1168H (*pep4*) zur Expression der Laccasen steigerte hingegen nicht, wie in der Literatur beschrieben (Jonsson et al. 1997), die Ausbeute der Enzyme. Vermutlich werden während der Expression der Laccasen im *P. pastoris*-Wildtypstamm kaum Proteasen freigesetzt und die Laccasen somit nicht oder kaum degradiert, so dass die Verwendung eines Protease-defizienten *Pichia*-Stammes zu keiner weiteren Steigerung der volumetrischen Aktivität der Laccasen führte. Durch Hochzelldichte-Kultivierungen von *P. pastoris* konnten die volumetrischen Aktivitäten auf 820 U l⁻¹ für Lcc α , auf 3400 U l⁻¹ für Lcc β , auf 1280 U l⁻¹ für Lcc γ und auf 1550 U l⁻¹ für Lcc δ gesteigert werden. Die Ausbeuten an Lcc α und Lcc β waren höher als bisher in der Literatur beschrieben (Bohlin et al. 2006, O'Callaghan et al. 2002) und zeigen, dass die heterologe Produktion von isolierten Laccasen für biotechnologische Anwendungen möglich ist.

Die exprimierten Laccasen wurden über hydrophobe Interaktions- und Gelfiltrationschromatographie aufgereinigt. Die Laccasen wiesen alle eine molekulare Masse von circa 72 kDa auf. Diese liegt deutlich über der berechneten molekularen Masse von circa 54 kDa. Der Unterschied tritt offensichtlich durch Glykosylierung der Laccasen in *P. pastoris* auf. Die Laccasen werden in *T. versicolor* ebenfalls glykosyliert, allerdings nicht so stark wie in *P. pastoris* (64 kDa gegenüber 72 kDa). Das pH-Optimum lag mit ABTS als Substrat von Lcc α bei 1,9, von Lcc β bei 2,3 und von Lcc γ und Lcc δ bei 3,1. Das pH-Optimum ist vom Substrat abhängig und liegt bei Laccasen aus Pilzen mit ABTS typischerweise zwischen 2,0-4,0 und mit Syringaldazin zwischen 6,0-7,0 (Baldrian 2006). Bei sehr niedrigen pH-Werten waren die Enzyme allerdings nicht stabil. So waren nach 20 h Inkubation bei Raumtemperatur und pH 2,0 nur noch 0-35% der ursprünglichen Aktivität der Laccasen erhalten. Lcc α und Lcc β zeigten hingegen gute Stabilität bei pH 3,0-5,0 (80-95% Restaktivität nach 20 h), während Lcc γ nach 20 h bei pH 3,0 nur noch 45% an Aktivität zeigte und Lcc δ bereits nach 3 h bei pH 3,0 vollständig inaktiviert war. Die höchste Stabilität bei Raumtemperatur zeigten die Laccasen bei pH 5,0, was dem pH-Wert der natürlichen Umgebung

von *T. versicolor* eher entspricht. $Lcc\alpha$ und $Lcc\beta$ waren bei pH 5,0 ebenfalls deutlich stabiler (90,7% bzw. 87% Restaktivität nach 24 h) als $Lcc\gamma$ und $Lcc\delta$ (76% bzw. 36% Restaktivität nach 24 h). Auch bei höheren Temperaturen zeigten $Lcc\alpha$ und $Lcc\beta$ deutlich höhere Aktivität und Stabilität als $Lcc\gamma$ und $Lcc\delta$. Das Temperaturmaximum von $Lcc\alpha$ und $Lcc\beta$ lag mit ABTS als Substrat bei 75°C bzw. 80°C, während es von $Lcc\gamma$ und $Lcc\delta$ bei nur 60°C bzw. 45°C lag. Die Laccasen waren bei den jeweiligen Temperaturen aber nicht stabil. So wies $Lcc\gamma$ nach 20 min Inkubation bei 60°C nur noch 14% der Aktivität bei 25°C auf und $Lcc\delta$ zeigte nach 20 min bei 40°C nur noch eine Aktivität von 40%. $Lcc\alpha$ und $Lcc\beta$ wiesen nach 20 min Inkubation bei 40°C, 50°C sowie 60°C hingegen nahezu keinen Aktivitätsverlust auf. Nach 20-minütiger Inkubation bei 70°C waren von $Lcc\alpha$ und $Lcc\beta$ noch 25% bzw. 62% ihrer ursprünglichen Aktivität bei 25°C erhalten, wohingegen $Lcc\gamma$ und $Lcc\delta$ vollständig inaktiviert waren.

Die mit ABTS als Substrat bestimmten K_M - und k_{cat} -Werte von $Lcc\alpha$ und $Lcc\beta$ stimmen gut mit Literaturwerten anderer Laccasen aus Pilzen überein (Bertrand et al. 2002, Necochea et al. 2005), waren allerdings deutlich niedriger als die Werte von $Lcc\gamma$ und $Lcc\delta$. Aus den vorliegenden Ergebnissen konnte geschlossen werden, dass $Lcc\alpha$ und $Lcc\beta$ ähnliche biochemische Eigenschaften aufweisen, die sich jedoch deutlich von denen der Laccasen $Lcc\gamma$ und $Lcc\delta$ unterscheiden. Zudem wurde $Lcc\beta$ als stabilste Laccase aus *T. versicolor*, mit hoher Stabilität bei Raumtemperatur sowie bei erhöhten Temperaturen, identifiziert.

Nachfolgend wurden die Aktivitäten der Laccasen gegenüber verschiedenen Substraten bestimmt. Wie bereits erwähnt, stellt die oxidative Kupplung von phenolischen Säuren einen möglichen Anwendungsbereich von Laccasen zur Synthese von Naturstoffen dar (Mustafa et al. 2005). Hier wurde beispielhaft die Dimerisierung von Sinapinsäure durch die Laccasen mit Hilfe von HPLC-Analysen untersucht. Alle vier Laccasen katalysierten regioselektiv die oxidative C–C-Kupplung von Sinapinsäure zum Dehydrodisinapinsäuredilakton, zeigten aber sehr unterschiedliche Aktivitäten (siehe Abbildung 3, Seite 56 (Koschorreck et al. 2008b)). $Lcc\delta$ wies die höchste Aktivität gegenüber Sinapinsäure auf (98% Umsatz von 5 mM Substrat nach 20 min), während $Lcc\alpha$ die niedrigste Aktivität zeigte (34% Umsatz nach 20 min). Mit $Lcc\beta$ und $Lcc\gamma$ lag der Umsatz von Sinapinsäure nach 20 min bei 50% bzw. 48%.

Zusätzlich wurde die Aktivität der Enzyme gegenüber einer völlig anderen Klasse von Substraten, den polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen untersucht. Wie bereits erwähnt, können Laccasen zum Abbau dieser karzinogenen Schadstoffe eingesetzt werden. Die Oxidation von 0,1 mM Naphthalin, Fluoren, Anthracen, Phenanthren, Acenaphthen und Acenaphthylen durch die Laccasen wurde in An- und Abwesenheit des Redoxmediators

ABTS untersucht. Nach 72 h Reaktion wurden die Umsetzungen mittels GC/MS-Messungen analysiert. Die Laccasen zeigten gegenüber den polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen ebenfalls sehr unterschiedliche Aktivitäten. Die Substrate wurden sowohl mit als auch ohne ABTS-Zugabe am besten mit Lcc β umgesetzt, während Lcc δ selbst mit ABTS nur eine sehr geringe Aktivität aufwies. Lcc α und Lcc γ zeigten teilweise deutlich höhere Aktivität als Lcc δ , waren aber weniger aktiv als Lcc β . Wie in der Literatur beschrieben, verbesserte die Zugabe von ABTS die Oxidation der Substrate deutlich (Johannes et al. 1996, Johannes et al. 1998). So wurde Anthracen nur in Anwesenheit von ABTS von den Laccasen oxidiert, wobei Lcc β die höchste Aktivität aufwies (83% Umsatz). Das Produkt dieser Oxidation wurde als 9,10-Anthrachinon identifiziert. Ferner oxidierte Lcc β unter Zugabe von ABTS Fluoren zu 82% zu Fluorenol und Fluorenon (Verhältnis 1:1) sowie Acenaphthen zu beinahe 100% zu 1-Acenaphthol, 1,2-Acenaphthenchinon und 1,8-Naphthalsäureanhydrid (Verhältnis 1:3:6). Die Oxidation von Acenaphthylen durch Lcc β wurde durch Zugabe von ABTS von 18% auf 85% gesteigert. Als Reaktionsprodukte wurden 1,2-Acenaphthenchinon und 1,8-Naphthalsäureanhydrid identifiziert (Verhältnis 1:3,3). Somit wurden mit dem Lcc β -ABTS-System höhere Aktivitäten gegenüber Anthracen, Acenaphthen und Acenaphthylen erzielt als mit einem Gemisch von Laccasen aus *T. versicolor* und ABTS (Johannes et al. 1996, Johannes et al. 1998). Naphthalin und Phenanthren wurden nicht von den Laccasen oxidiert. Bemerkenswerterweise zeigten die Laccasen neben unterschiedlichen Aktivitäten auch verschiedene Produktverteilungen. So konnte 1,2-Acenaphthenchinon nicht als Produkt bei der Oxidation von Acenaphthen und Acenaphthylen durch Lcc α detektiert werden, obwohl es in den Umsetzungen der anderen Laccasen nachgewiesen wurde. Die erhaltenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass ABTS bei den Reaktionen wahrscheinlich nicht als diffusibler Elektronenüberträger auftritt (Bourbonnais et al. 1995), sondern das Redoxpotenzial der Laccasen erhöht und somit die Oxidation der Substrate durch die Enzyme selbst ermöglicht (Potthast et al. 1995).

Anhand der erhaltenen Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass sich die verschiedenen Laccase-Isoformen aus *T. versicolor* deutlich in ihrer Stabilität wie auch in ihrer Aktivität gegenüber verschiedenen Substraten unterscheiden. Lcc β wurde als stabilste Laccase aus *T. versicolor* mit einer hohen Aktivität gegenüber verschiedenen Substraten identifiziert. Dabei konnte gezeigt werden, dass Lcc β für einen Einsatz in der Biokatalyse geeignet ist.

Weiterhin sollten die Aminosäuren, die zur Substratbindung in den Laccasen beitragen, identifiziert und durch deren gezielte Veränderung die Aktivität von Lcc β gegenüber Sinapinsäure erhöht werden. Der strukturelle Hintergrund der beobachteten unterschiedlichen

Laccase-Aktivitäten wurde mit Hilfe von vier Homologiemodellen untersucht, die anhand der Struktur der *T. versicolor* Laccase TvL (Laccase-Isoform α) erstellt wurden (Piontek et al. 2002). Viele an der Kupferkoordination oder Substratbindung beteiligte Aminosäuren sind hoch konserviert in allen vier Laccasen. Dennoch konnten im aktiven Zentrum der Enzyme die Positionen 164 und 265 identifiziert werden, die vermutlich an der Substratbindung beteiligt, aber innerhalb der Laccasen nicht konserviert sind (siehe Abbildung 6, Seite 57 (Koschorreck et al. 2008b)). Die Laccase Lcc δ , die eine hohe C–C-Kupplungsaktivität zeigte, weist an Position 164 Valin und an Position 265 Alanin auf. Lcc β mit geringerer C–C-Kupplungsaktivität, jedoch höherer Aktivität gegenüber polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen als Lcc δ trägt Leucin an Position 164 und Phenylalanin an Position 265. Um den Einfluss dieser Positionen auf die Aktivität der Laccasen in Kupplungs- und Oxidationsreaktionen zu untersuchen und dabei die Phenolkupplungsaktivität von Lcc β zu erhöhen, wurden Leucin 164 und Phenylalanin 265 in Lcc β gegen Valin beziehungsweise Alanin ausgetauscht. Die Aktivität von Lcc β gegenüber Sinapinsäure wurde jedoch durch die Mutationen kaum beeinflusst. Allerdings war die Aktivität der Lcc β -Varianten Lcc β _L164V, Lcc β _F265A und Lcc β _L164V_F265A gegenüber Anthracen drastisch reduziert. Somit konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuren an den Positionen 164 und 265 an der Bindung und Stabilisierung von größeren hydrophoben polyaromatischen Verbindungen in Lcc β beteiligt sind. Da sich die Aminosäuren an diesen Positionen innerhalb der Laccasen unterscheiden, erklärt das zumindest teilweise die unterschiedlichen Aktivitäten der Enzyme gegenüber den untersuchten polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen.

2.2. Klonierung und Expression einer neuen Laccase aus *Bacillus licheniformis* zur Dimerisierung von phenolischen Säuren

siehe auch Manuskript: “Cloning and characterization of a new laccase from *Bacillus licheniformis* catalyzing dimerization of phenolic acids”, Seite 61 (Koschorreck et al. 2008a)

Bisher wurden nur sehr wenige bakterielle Laccasen kloniert und charakterisiert. Über die Einsetzbarkeit dieser Enzyme in der Biokatalyse ist deshalb nur wenig bekannt. Um die Kenntnisse über bakterielle Laccasen zu erweitern und diese Enzyme ebenfalls für die Biotechnologie nutzbar zu machen, sollte eine neue Laccase kloniert und anschließend eingehend charakterisiert werden. Zuerst wurde nach einer neuen bakteriellen Laccase gesucht, die nachfolgend erfolgreich in *E. coli* überexprimiert wurde. Bei der Charakterisie-

rung der Laccase stand die Bestimmung der Substratspezifität sowie der Aktivität des Enzyms bei der Katalyse oxidativer Phenolkupplungen von verschiedenen phenolischen Säuren im Vordergrund.

Aus einer großen Anzahl an DNA- und Proteindatenbank-Einträgen über mutmaßliche „blaue Kupferproteine“ aus verschiedenen Bacilli, Streptomyceten und Pseudomonaden wurde CotA aus *Bacillus licheniformis* ausgewählt. Das *cotA*-Gen ist als „äußeres Sporenhüllprotein“ annotiert und besitzt die für Laccasen typischen vier Histidin-reichen Kupferbindestellen. Die Aminosäuresequenz von CotA aus *B. licheniformis* weist zu derjenigen von CotA aus *B. subtilis* einen hohen Anteil identischer bzw. ähnlicher Aminosäurereste auf (63%), während die Ähnlichkeit zu CueO aus *E. coli* und Lcc2 aus *T. versicolor* sehr gering ist (25% bzw. 11%). Das *cotA*-Gen wurde anhand von spezifischen Primern aus der genomischen DNA von *B. licheniformis* DSM 13 amplifiziert und in den pET22b+-Expressionsvektor unter Kontrolle des IPTG-induzierbaren T7-Promotors (T7-Phage) kloniert. Der T7-Promotor wird nur von der T7-RNA-Polymerase erkannt. Diese ist in *E. coli*-Zellen die das DE3-Fragment des T7-Phagens enthalten, genomisch kodiert und befindet sich unter der Kontrolle des *lacUV5*-Promotors (Studier und Moffatt 1986). Die Transkription ausgehend vom *lacUV5*- wie auch vom T7-Promotor wird durch die Bindung des *lacI*-Repressors an den *lacO*-Operator reprimiert. Durch Zugabe von IPTG wird die Repressorbindung aufgehoben und die Transkription gestartet. Die Expression von *cotA* erfolgte in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen. Wie auch bei der Expression der Laccasen aus *T. versicolor* konnte die Ausbeute an löslichem CotA durch Herabsetzen der Temperatur sowie durch Zugabe von Kupfer verbessert werden. So wurde die höchste volumetrische Aktivität von CotA nach einer Übernacht-Expression bei 18°C in Terrific-Broth (TB)-Medium mit 2,0 mM CuSO₄ erhalten (0,37 U ml⁻¹ mit ABTS als Substrat). Kupferkonzentrationen über 2 mM wirkten sich negativ auf das Zellwachstum aus und führten zu keiner weiteren Erhöhung der volumetrischen Aktivität. Unter den optimierten Expressionsbedingungen betrug der Anteil von löslichem CotA am löslichen Gesamtprotein circa 15%. Es wurde aber auch ein großer Teil von CotA in *inclusion bodies* vorgefunden. Insgesamt lagen circa 20% von CotA löslich im Cytosol vor, während rund 80% inaktiv in *inclusion bodies* vorgefunden wurden. Im Verlaufe der Arbeit konnte die volumetrische Aktivität von CotA auf 0,41 U ml⁻¹ erhöht werden, indem die Laccase-Expression bei einer OD_{578 nm} der *E. coli*-Zellen von 1,8 statt 1,6 induziert wurde. Die anschließende Aufreinigung von CotA umfasste eine Hitzeinkubation für 15 min bei 70°C und zwei Anionenaustauschchromatographien. Bei der Hitzeinkubation präzipitierten die meisten Wirtsproteine, während CotA aktiv blieb. Im Verlaufe der Aufreinigung stellte sich heraus, dass nur ein geringer Teil

des exprimierten Enzyms aktiv war, was vermutlich auf einen ineffizienten Kupfereinbau zurückzuführen ist. Insgesamt lag der Anteil an CotA, der Aktivität gegenüber ABTS zeigte, bei nur 2% gemessen am Gesamtproteingehalt. Im Gegensatz zu CueO aus *E. coli* konnte inaktives CotA nicht durch Kupferbeladung in aktives Enzym überführt werden (Li et al. 2007). Das aufgereinigte Enzym wies eine molekulare Masse von 65 kDa sowie eine spezifische Aktivität gegenüber ABTS von 16 U mg^{-1} und gegenüber Syringaldazin von $18,7 \text{ U mg}^{-1}$ auf. Es konnten etwa 10 mg an aktivem und aufgereinigtem CotA aus 1 l *E. coli*-Kultur erhalten werden.

Aufgereinigtes CotA zeigte die typische blaue Farbe der „blauen Kupferproteine“. Das Absorptionsspektrum von CotA wies ein Maximum bei 575-600 nm (Typ-1-Kupferzentrum) und bei 330 nm (Typ-3-Kupferzentrum) auf. Elektronen-Spin-Resonanz-Messungen bestätigten das Vorhandensein der Typ-1- und Typ-2-Kupferzentren, zeigten aber auch, dass nur 18% von CotA Typ-1-Kupfer enthielten. Die über ESR-Spektroskopie ermittelten g -Faktoren und Hyperfeinkopplungskonstanten des Typ-1-Kupferzentrums ($g_{\perp} = 2.011$, $g_{\parallel} = 2.230$, $A_{\parallel} = 80 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$) und Typ-2-Kupferzentrums ($g_{\perp} = 2.060$, $g_{\parallel} = 2.395$, $A_{\parallel} = 207 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$) sind vergleichbar mit anderen Laccasen (Solomon et al. 1996). Aufgrund der spektroskopischen Eigenschaften und der Fähigkeit das typische Laccase-Substrat Syringaldazin zu oxidieren, wurde CotA als eine Laccase identifiziert. Das pH-Optimum von CotA lag mit ABTS als Substrat bei 4,2 und mit Syringaldazin und 2,6-Dimethoxyphenol bei 7,0. Entsprechende Werte wurden auch für andere Laccasen gemessen (Kiiskinen et al. 2002, Martins et al. 2002). Die höchste Aktivität von CotA wurde mit ABTS bei 85°C erreicht. CotA aus *B. licheniformis* ist zwar kein thermostabiles Enzym wie CotA aus *B. subtilis* (Martins et al. 2002), wies aber nach 1 h Inkubation bei 70°C noch 43% seiner ursprünglichen Aktivität auf. Das ist vergleichbar mit der Stabilität der bakteriellen Laccase CueO (Roberts et al. 2003). Die mit ABTS, Syringaldazin und 2,6-Dimethoxyphenol gemessenen k_{cat} -Werte von CotA stimmten gut mit denen anderer bakterieller Laccasen überein (Martins et al. 2002, Miyazaki 2005, Roberts et al. 2002). Die Affinität gegen diese Substrate war hingegen deutlich höher, verglichen mit in der Literatur beschriebenen Werten (Miyazaki 2005, Roberts et al. 2002).

Die Katalyse oxidativer Phenolkupplungen durch CotA wurde mit den phenolischen Säuren Sinapinsäure, Ferulasäure, Kaffeesäure, *p*-Cumarsäure, Syringasäure und Vanillinsäure sowie der nicht-phenolischen Zimtsäure als Substrate untersucht (siehe Abbildung 3, Seite 74 (Koschorreck et al. 2008a)). Der Verlauf der Reaktionen wurde anhand von HPLC-

Messungen über 120 min verfolgt und die Produkte nachfolgend über LC/MS-Analysen identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass CotA die oxidative Phenolkupplung von Sinapinsäure, Ferulasäure und Kaffeesäure katalysiert. Der höchste Umsatz wurde mit Sinapinsäure erzielt (66% Umsatz von 5 mM Substrat nach 120 min). Als Hauptprodukt der Sinapinsäureumsetzung wurde das Dimer Dehydrodisinapinsäuredilakton identifiziert (79% Anteil am Gesamtprodukt). Deutlich geringere Aktivität zeigte CotA mit Kaffeesäure und Syringasäure (jeweils 22% Umsatz nach 120 min) sowie mit Ferulasäure (15% Umsatz nach 120 min). Syringasäure wurde von CotA ausschließlich zum 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinon oxidiert. Die oxidative Phenolkupplung von Syringasäure wurde mit Laccasen aus *Rhizoctonia praticola* und *T. versicolor* hingegen beschrieben (Leonowicz et al. 1984). Die Hauptprodukte, die bei der Umsetzung von Ferulasäure und Kaffeesäure entstanden, wurden als Dimere der Säuren identifiziert. Die genauen Strukturen konnten aufgrund der geringen Produktausbeute nicht bestimmt werden. Bei der Reaktion mit Ferulasäure traten insgesamt fünf Produkte auf, wobei das Hauptprodukt darunter einen Anteil von 56% aufwies. Bei der Oxidation von Kaffeesäure durch CotA wurden als Hauptprodukte zwei Dimere identifiziert (41% und 38% Produktanteil) und ein unbekanntes Nebenprodukt nachgewiesen. Kaffeesäure kann im Gegensatz zu Ferulasäure nicht nur über die Propensäureseitengruppe gekuppelt werden, sondern auch über den 3,4-Dihydroxyphenylrest der einen und die Propensäureseitengruppe der anderen Säure (Pati et al. 2006) (siehe Abbildung 6, Seite 75 (Koschorreck et al. 2008a)). Dadurch sind bei der Oxidation von Kaffeesäure zwei Hauptprodukte mit ähnlichem Produktanteil denkbar. *p*-Cumarsäure, Vanillinsäure und Zimtsäure wurden von CotA nicht umgesetzt. Laccasen aus *R. praticola* und *T. versicolor* katalysierten jedoch im Gegensatz zu CotA die Oxidation und Dimerisierung von Vanillinsäure (Leonowicz et al. 1984).

Die Ergebnisse zeigten, dass die Oxidation von phenolischen Säuren durch CotA von den substituierenden Gruppen in *ortho*-Position der Phenolgruppe und von der Alkylkettenlänge der Säureseitengruppe abhängt. So wurden Ferulasäure und Kaffeesäure mit nur einer Substitution in *ortho*-Position der Phenylgruppe deutlich schlechter umgesetzt, als Sinapinsäure mit zwei *ortho*-Substituenten. Die Substituenten in *ortho*-Position der Phenolgruppe scheinen demnach für die Bindung oder Stabilisierung der Substrate in CotA eine wichtige Rolle zu spielen. *p*-Cumarsäure und Zimtsäure ohne Substituenten in *ortho*-Position wurden deshalb wahrscheinlich nicht oxidiert. Die Aktivität von CotA gegenüber Syringasäure (4-Hydroxy-3,5-dimethoxybenzoesäure) war deutlich geringer als gegenüber Sinapinsäure (4-Hydroxy-3,5-dimethoxyzimtsäure), die eine C3-Alkylkette aufweist. Vanillinsäure (4-Hydroxy-3-methoxybenzoesäure) scheint zu klein zu sein, um effektiv im

aktiven Zentrum von CotA gebunden und oxidiert werden zu können. Folglich hat die Länge der Alkylkette der Säureseitengruppe ebenfalls einen maßgeblichen Einfluss auf die Bindung und Oxidation von phenolischen Säuren. Vermutlich weist CotA eine große Substratbindestelle auf, weshalb vor allem größere Substrate fixiert und dimerisiert werden können.

2.3. Verbesserung der Expression und der katalytischen Aktivität einer bakteriellen Laccase durch Zufalls- und ortsgerichtete Mutagenese

siehe auch Manuskript: “Improving expression level and catalytic activity of a bacterial laccase by random and site-directed mutagenesis”, Seite 80

Wie gezeigt werden konnte, katalysiert die bakterielle Laccase CotA die oxidative Phenolkupplung von Sinapinsäure, Ferulasäure und Kaffeesäure. Im Vergleich zu den Laccasen aus *T. versicolor* war die Aktivität von CotA gegenüber beispielsweise Sinapinsäure aber deutlich geringer. Außerdem war die Expression von CotA in *E. coli* zwar erfolgreich, die erzielten Ausbeuten jedoch zu gering um das Enzym in der Biokatalyse einzusetzen. Um die Expression und Aktivität von CotA zu verbessern, wurde die Laccase durch eine Kombination aus Zufalls- und ortsgerichteter Mutagenese verändert. Die erzeugten CotA-Varianten wurden charakterisiert und hinsichtlich der Expression sowie der Aktivität gegenüber phenolischen Säuren, als auch anhand der Entfärbung von verschiedenen Farbstoffen verglichen.

Das *cotA*-Gen wurde zuerst über Zufallsmutagenese (error-prone PCR) verändert und nachfolgend in den pET22b+-Vektor unter Kontrolle des T7-Promotors ligiert. Nach Transformation von *E. coli* NovaBlue(DE3)-Zellen wurden 10 000 Klone erhalten. *E. coli* NovaBlue(DE3)-Zellen weisen eine hohe Transformationseffizienz auf und ermöglichen die Isolation von Plasmiden wie auch die Expression von Genen mit hohen Ausbeuten. Die Sequenzierung von zehn Klonen ergab eine relativ niedrige Mutationsrate von 1-5 Nukleotidaustauschen pro Laccasegen. Sechstausend Klone wurden anschließend im Mikrotiterplattenmaßstab exprimiert und im Hochdurchsatzverfahren auf eine erhöhte Aktivität gegenüber ABTS durchmustert. Die Oxidation von ABTS kann photometrisch bei 420 nm gemessen werden und lässt sich einfach, schnell und reproduzierbar im Hochdurchsatzverfahren durchführen. Trotz geringer Mutationsfrequenz waren etwa 38% der

Klone inaktiv. Festa et al. beschrieben ebenfalls eine relativ hohe Inaktivierungsrate von Laccasen bei niedriger Mutationsfrequenz (Festa et al. 2008). Viele Bereiche in Laccasen sind hoch konserviert, da sie zur Kupferbindung beitragen, während andere Bereiche für die Enzymfunktion essentiell sind. Vermutlich können deshalb nur wenige Mutationen in Laccasegenen eingeführt werden, ohne zu einem Funktionsverlust der Enzyme zu führen (Festa et al. 2008).

Insgesamt wurden zwanzig Klone mit höherer Aktivität gegenüber ABTS im Vergleich zu CotA-Wildtyp zur weiteren Untersuchung ausgewählt. Nach Expression im Schüttelkolbenmaßstab zeigten von diesen jedoch nur acht tatsächlich eine höhere volumetrische Aktivität als der Wildtyp. Die Sequenzierung dieser CotA-Varianten ergab, dass in jedem Enzym 1-3 Aminosäuren verändert waren, wobei die Mutationen K316N und D500N mehrfach auftraten. Ein Sequenzvergleich des *cotA*-Gens mit anderen Laccasegenen aus Pilzen und Bakterien zeigte, dass die Aminosäure an Position 500 von CotA hoch konserviert in anderen Laccasen ist (siehe Abbildung 1, Seite 93). Bis auf CotA aus *B. subtilis* und *B. licheniformis*, die Asparaginsäure an dieser Position aufweisen, tritt in allen anderen Laccase-Sequenzen Glycin an entsprechender Stelle auf. Position 316 ist hingegen nicht konserviert. Um den Einfluss der Positionen 316 und 500 auf die Aktivität und die Expression von CotA zu untersuchen, wurden die CotA-Varianten K316N, D500N und D500G durch ortsgerichtete Mutagenese erzeugt. Die volumetrische Aktivität der Enzyme wurde mit ABTS als Substrat bestimmt. K316N und D500N wiesen mit $1,1 \text{ U ml}^{-1}$ und $0,87 \text{ U ml}^{-1}$ eine mehr als doppelt so hohe volumetrische Aktivität als der Wildtyp mit $0,41 \text{ U ml}^{-1}$ auf. Der Austausch von Asparaginsäure 500 in CotA gegen das hoch konservierte Glycin erhöhte hingegen die volumetrische Aktivität von D500G gegenüber dem Wildtyp um das 5,4-fache ($2,2 \text{ U ml}^{-1}$). Die Einführung beider Mutationen, K316N und D500G, in CotA ergab eine 8,3-fach höhere volumetrische Aktivität von K316N/D500G ($3,4 \text{ U ml}^{-1}$) gegenüber CotA-Wildtyp. Zur eingehenden Charakterisierung der CotA-Varianten K316N, D500G und K316N/D500G wurden diese über Hitzedenaturierung und Anionenaustauschchromatographie aufgereinigt.

Die CotA-Varianten zeigten gegenüber dem Wildtyp mit ABTS als Substrat nur leicht veränderte K_M -Werte und spezifische Aktivitäten. Die mit ABTS gemessenen höheren volumetrischen Aktivitäten können demzufolge auf eine erhöhte Expression der CotA-Varianten zurückgeführt werden. Bezogen auf die spezifische Aktivität der Laccasen wurde durch Einführung der Mutationen K316N und D500G in CotA die Expression des Enzyms um einen Faktor von 11,4 verbessert. Somit können nun rund 300 mg der CotA-Variante

K316N/D500G aus 1 l Kultur von *E. coli*-Zellen erhalten werden. Diese mit *E. coli* erzielte Laccase-Ausbeute ist deutlich höher, als die mit *Pichia*-Kulturen exprimierten Mengen an Pilzlaccasen (Colao et al. 2006, Hong et al. 2006, O'Callaghan et al. 2002). Die Ausbeute ist hingegen vergleichbar mit derjenigen einer Laccase aus *Melanocarpus albomyces*, die in *Trichoderma reesei* im Schüttelkolbenmaßstab exprimiert wurde (Kiiskinen et al. 2004).

Die Stabilität der CotA-Varianten wurde nachfolgend bei 70°C sowie bei Raumtemperatur bei pH 4,0, 5,0 und 7,0 untersucht. Die Aktivität der Enzyme unter den jeweiligen Bedingungen wurde anhand von drei unabhängigen Messungen bestimmt. Die Standardabweichungen betragen dabei weniger als 5%. Der pH-Wert hatte einen erheblichen Einfluss auf die Stabilität der Laccasen. Bei pH 4,0 waren die CotA-Varianten deutlich instabiler als CotA-Wildtyp, während bei pH 5,0 und 7,0 die Stabilitäten der CotA-Varianten nicht sehr stark vom Wildtyp abwichen. So wurde K316N/D500G durch Inkubation für 30 min bei 70°C und pH 4,0 vollständig inaktiviert. K316N und D500G zeigten unter diesen Bedingungen nur noch 25% bzw. 28% ihrer ursprünglichen Aktivität, während CotA-Wildtyp noch 58% an Aktivität aufwies. Nach 30 min Inkubation bei pH 7,0 und 70°C wiesen alle Laccasen hingegen noch 81-82% ihrer ursprünglichen Aktivität auf. Nach 24 h Inkubation bei Raumtemperatur bei pH 5,0 und 7,0 zeigten K316N und K316N/D500G noch 80% bzw. 81% ihrer ursprünglichen Aktivität. Die Stabilität von D500G und CotA-Wildtyp war bei diesen pH-Werten hingegen etwas höher (90-93% Restaktivität). Insgesamt war die Stabilität von D500G bei pH 5,0 und 7,0 vergleichbar mit CotA-Wildtyp, während K316N und K316N/D500G eine geringere Stabilität zeigten.

Weiterhin wurde untersucht, ob die oxidative Phenolkupplungsaktivität von CotA durch die eingeführten Mutationen verbessert wurde. Sinapinsäure, Ferulasäure, Kaffeesäure, *p*-Cumarsäure, Syringasäure, Vanillinsäure und Zimtsäure wurden als Substrate in einer Konzentration von 5 mM eingesetzt. Der Verlauf der Reaktionen wurde anhand von HPLC-Analysen über 90 min verfolgt und die Produkte anschließend über LC/MS-Analysen identifiziert. Die Reaktionen wurden jeweils dreimal durchgeführt. Die Standardabweichungen waren dabei nicht größer als 2,5%. *p*-Cumarsäure, Vanillinsäure und Zimtsäure wurden weder von CotA-Wildtyp noch von den CotA-Varianten umgesetzt. CotA-Wildtyp zeigte im Vergleich zu den CotA-Varianten die höchste spezifische Aktivität gegenüber Sinapinsäure, allerdings wies K316N/D500G nur eine geringfügig niedrigere spezifische Aktivität als der Wildtyp auf (45% Umsatz gegenüber 49% Umsatz nach 90 min). Die spezifische Aktivität von K316N/D500G mit Ferulasäure war hingegen mit 21% Umsatz nach 90 min circa 50% höher

als die spezifische Aktivität von CotA-Wildtyp mit 14% Umsatz nach 90 min. Mit Kaffeesäure als Substrat war die spezifische Aktivität von K316N/D500G mit 20% Umsatz nach 90 min leicht erhöht gegenüber CotA-Wildtyp mit 18% Umsatz nach 90 min. Die Oxidation von Syringasäure wurde hingegen nicht verbessert (18% Umsatz nach 90 min). Im Gegensatz zu Sinapinsäure und Syringasäure weisen Ferulasäure und Kaffeesäure nur einen Substituenten in *ortho*-Position der Phenolgruppe auf. Die Mutationen in K316N/D500G könnten daher zu einer besseren Bindung oder Stabilisierung von einfach-substituierten phenolischen Säuren wie Ferulasäure oder Kaffeesäure gegenüber zweifach-substituierten phenolischen Säuren beitragen. Dies würde erklären, weshalb K316N/D500G nur gegenüber Ferulasäure und Kaffeesäure eine verbesserte Aktivität zeigte, nicht aber gegenüber Sinapinsäure und Syringasäure.

Die beiden CotA-Varianten K316N und D500G wiesen fast ausschließlich eine deutlich niedrigere spezifische Aktivität gegenüber Sinapinsäure, Ferulasäure, Kaffeesäure und Syringasäure verglichen mit CotA-Wildtyp auf. K316N war jedoch deutlich aktiver als D500G und zeigte gegenüber Ferulasäure sogar eine leicht höhere spezifische Aktivität als der Wildtyp (15% gegenüber 14% Umsatz nach 90 min).

Das Produktspektrum sowie die Art der Reaktion wurde von den Mutationen nicht beeinflusst. Die Hauptprodukte der Umsetzung von Sinapinsäure, Ferulasäure und Kaffeesäure wurden als Dimere der Säuren identifiziert, während Syringasäure auch von den CotA-Varianten ausschließlich zum 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinon oxidiert wurde. Das Hauptprodukt der Sinapinsäureumsetzung wurde als Dehydrodisinapinsäuredilakton, mit einem Produktanteil von 79% gemessen am Gesamtprodukt, identifiziert.

Zusätzlich sollte untersucht werden, ob die CotA-Varianten mit weiteren Substraten eine, gegenüber dem Wildtyp, veränderte Aktivität aufwiesen. Wie bereits erwähnt, werden Laccasen industriell zur Farbstoffbleiche eingesetzt. Die CotA-Varianten sowie CotA-Wildtyp wurden deshalb hinsichtlich ihrer Aktivität bei der Entfärbung der Farbstoffe Alizarin Red S, Remazol Brilliant Blue R und Indigocarmin untersucht (siehe Abbildung 3, Seite 94). Die enzymatische Entfärbung wurde dabei in An- wie in Abwesenheit des Redoxmediators Violursäure durchgeführt und photometrisch über 1 h verfolgt. Die Aktivität der Laccasen wurde dabei anhand der relativen Abnahme der Absorption beim Absorptionsmaximum des jeweiligen Farbstoffes bestimmt. ABTS als Redoxmediator ist aufgrund der stark blauen Farbe des Kationradikals als Redoxmediator für Entfärbungen ungeeignet. HBT inhibierte hingegen die Laccasen (Daten nicht gezeigt).

K316N/D500G zeigte gegenüber allen drei Farbstoffen sowohl mit als auch ohne Zugabe von Violursäure die höchste spezifische Aktivität. Im Allgemeinen erhöhte die Zugabe von Violursäure die Entfärbung der Farbstoffe durch die Laccasen, wie dies auch in der Literatur beschrieben wurde (Soares et al. 2001, Wong und Yu 1999). Die Entfärbung von Alizarin Red S durch die Laccasen wurde nur geringfügig durch Violursäurezugabe verbessert, während Remazol Brilliant Blue R erst durch Zugabe des Redoxmediators oxidiert werden konnte. Die Entfärbung von Indigocarmin durch die Laccasen wurde ebenfalls sehr stark durch die Zugabe von Violursäure verbessert. In Abwesenheit der Laccasen fand keinerlei Entfärbung der Farbstoffe statt.

Alizarin Red S wurde durch K316N und K316N/D500G nach bereits 5 min zu 36% bzw. 37% entfärbt, während die Entfärbung mit D500G und CotA-Wildtyp bei nur 16% bzw. 18% lag. Nach 60 min war Alizarin Red S unter Zugabe von Violursäure zwischen 67% (CotA-Wildtyp) und 76% (K316N/D500G) entfärbt. Remazol Brilliant Blue R wurde mit Hilfe von Violursäure von K316N/D500G nach 60 min zu 79% entfärbt, mit D500G jedoch nur zu 42%. Mit K316N und CotA-Wildtyp lag die Entfärbung nach 60 min bei 58% bzw. 56%. Indigocarmin wurde von allen Farbstoffen am besten entfärbt. Durch Zugabe von Violursäure betrug die Laccase-katalysierte Entfärbung nach 1 h nahezu 100%. Nach 30 min waren mit K316N und K316N/D500G bereits 87% bzw. 88% des Indigocarmins entfärbt, wohingegen mit D500G und CotA-Wildtyp nur 74% bzw. 75% entfärbt waren. Die CotA-Variante K316N/D500G wies demnach nicht nur eine verbesserte oxidative Phenolkupplung von Ferulasäure und Kaffeesäure, sondern auch eine erhöhte spezifische Aktivität gegenüber verschiedenen Farbstoffen, verglichen mit CotA-Wildtyp, auf. K316N zeigte im Vergleich zur CotA-Variante D500G eine höhere spezifische Aktivität gegenüber den untersuchten Farbstoffen wie auch gegenüber den untersuchten phenolischen Säuren. D500G wies bei der Farbstoffentfärbung von allen Laccasen die niedrigste spezifische Aktivität auf. Die Ergebnisse zeigten, dass sich die Mutation D500G negativ auf die Aktivität von CotA auswirkte, während die Mutation K316N die Aktivität von CotA gegenüber manchen Substraten verbesserte. Anhand der gemessenen Aktivitäten von K316N und D500G konnte demzufolge nicht auf die gesteigerte Aktivität von K316N/D500G geschlossen werden.

Die hohe Expression von K316N/D500G sowie die Umsetzung von phenolischen Säuren und Farbstoffen macht diese Laccase potenziell für den Einsatz in der Biokatalyse geeignet. So könnte diese Laccase zur Synthese von Naturstoffen durch oxidative Kupplung phenolischer Verbindungen wie auch zur Farbstoffbleiche eingesetzt werden.

Um den Einfluss der eingeführten Mutationen in CotA auf struktureller Ebene zu untersuchen, wurde anhand der Kristallstruktur von CotA aus *B. subtilis* (Enguita et al. 2003) ein Homologiemodell von CotA-Wildtyp und K316N/D500G erstellt (siehe Abbildung 5, Seite 95). Dieses zeigt, dass sich Glycin an Position 500 in K316N/D500G in einer Loopregion unmittelbar beim Typ-1-Kupferzentrum befindet. Position 500 ist zudem direkt benachbart zu Methionin 501, dem axialen Liganden des Typ-1-Kupferatoms. Wie bereits erwähnt, ist der axiale Ligand für das Redoxpotenzial wie auch für die katalytische Aktivität von Laccasen von starker Bedeutung (Melo et al. 2007). Durch den Austausch von Asparaginsäure 500 in CotA gegen das hoch konservierte, deutlich kleinere Glycin wird mehr Platz in der Region des Typ-1-Kupferzentrums geschaffen. Die damit möglicherweise einhergehenden strukturellen Veränderungen könnten zu einer effizienteren Kupferbindung führen. Dies würde die erhöhte Expression der CotA-Varianten D500G und K316N/D500G erklären. Strukturelle Veränderungen um den axialen Liganden des Typ-1-Kupferatoms könnten aber gleichzeitig auch zu einer Verminderung der katalytischen Aktivität der Laccase führen, wie dies bei der CotA-Variante D500G beobachtet wurde.

Asparagin an Position 316 befindet sich in K316N/D500G hingegen entfernt von den Kupferzentren am Ende eines β -Faltblattes an der Proteinoberfläche, weist aber in dessen Inneres. Asparagin 316 ist nicht konserviert wie Glycin 500, kann aber in einigen Laccasen aus Pilzen und Bakterien gefunden werden. Die Mutation K316N wirkte sich deutlich negativer auf die Stabilität von CotA aus als die Mutation D500G, führte allerdings im Gegensatz zur Mutation D500G zu einer Erhöhung der spezifischen Aktivität von CotA gegenüber einigen Substraten. Auch wurde die Expression von CotA durch die Einführung der Mutation K316N deutlich gesteigert. Eine Erklärung für den Einfluss von Position 316 auf die Stabilität, Aktivität und Expression von CotA konnte aus dem Homologiemodell nicht gefunden werden. Vermutlich hat das Einführen der Mutation K316N strukturelle Veränderungen des Enzyms zur Folge, die sich bis zum aktiven Zentrum hin auswirken. Der synergistische Effekt der Mutationen K316N und D500G, der zu einer Laccase mit deutlich erhöhter Aktivität und Expression führte, war anhand des Homologiemodells ebenfalls nicht erklärbar.

3. Publikationen und Publikationsmanuskripte

3.1. Comparative characterization of four laccases from *Trametes versicolor* concerning phenolic C–C coupling and oxidation of PAHs. Seite 52

(veröffentlicht in *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2008. 474: 213-219. (Koschorreck et al. 2008b))

3.2. Cloning and characterization of a new laccase from *Bacillus licheniformis* catalyzing dimerization of phenolic acids. Seite 61

(veröffentlicht in *Applied Microbiology and Biotechnology* 2008. 79: 217-224. (Koschorreck et al. 2008a))

3.3. Improving expression level and catalytic activity of a bacterial laccase by random and site-directed mutagenesis. Seite 80

(eingereicht bei *BMC Biotechnology*; derzeit unter fachlicher Begutachtung)

3.1. Comparative characterization of four laccases from *Trametes versicolor* concerning phenolic C–C coupling and oxidation of PAHs.

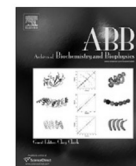
Archives of Biochemistry and Biophysics 474 (2008) 213–219



Contents lists available at ScienceDirect

Archives of Biochemistry and Biophysics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yabbi



Comparative characterization of four laccases from *Trametes versicolor* concerning phenolic C–C coupling and oxidation of PAHs

Katja Koschorreck^a, Sven M. Richter^a, André Swierczek^b, Uwe Beifuss^b, Rolf D. Schmid^a, Vlada B. Urlacher^{a,*}

^a Institute of Technical Biochemistry, University of Stuttgart, Allmandring 31, 70569 Stuttgart, Germany

^b Bioorganic Chemistry, Institute of Chemistry, University of Hohenheim, Garbenstrasse 30, 70599 Stuttgart, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 February 2008
and in revised form 7 March 2008
Available online 14 March 2008

Keywords:

Laccase
Trametes versicolor
Polycyclic aromatic hydrocarbons
Oxidation
C–C coupling
Site-directed mutagenesis

ABSTRACT

The laccase genes *lccα*, *lccβ*, *lccγ* and *lccδ* encoding four isoenzymes from *Trametes versicolor* have been cloned and expressed in *Pichia pastoris*. Biochemical characterization allowed classification of these laccases into two distinct groups: *Lccα* and *Lccβ* possessed higher thermal stability, but lower catalytic activity towards 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) compared to *Lccγ* and *Lccδ*. Activities of the laccases were quite different as well. Laccase *Lccδ* showed highest phenolic C–C coupling activity with sinapic acid, but lowest oxidizing activity towards polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Highest activity towards PAHs was observed with *Lccβ*. After 72 h, more than 80% of fluorene, anthracene, acenaphthene and acenaphthylene were oxidized by *Lccβ* in the presence of ABTS. Investigation of the structural basis of the different activities of the laccases demonstrated the impact of positions 164 and 265 in the substrate binding site on oxidation of PAHs.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Laccases (benzenediol:oxygen oxidoreductases, EC 1.10.3.2.) are very attractive enzymes for biocatalysis as they work with molecular oxygen at ambient temperatures, produce water as a by-product and do not require the costly co-factors NADH or NADPH as many other oxidoreductases. Based on their structural and mechanistic properties, laccases belong to the multicopper oxidase family. They are widely distributed among fungi, higher plants [1] and also bacteria [2]. In fungi laccases are involved in degradation of lignin [3], pigment production [4] and pathogenesis [5]. In plants they participate in lignification [6]. Laccases oxidize electron-rich compounds such as phenols, anilines, thiols, *N*-hydroxyl groups and many others by radical mechanism through the concomitant reduction of molecular oxygen to water [7]. Products of the laccase-catalyzed reactions, phenolic radicals, can undergo self-assembling by C–C and C–O coupling and build dimers or oligomers [8–10].

Laccases from the white rot fungus *Trametes versicolor* belong to the well studied laccases. A phylogenetic analysis of the laccases from *T. versicolor*, whose sequences have been reported so far, revealed four isoenzyme groups α , β , γ and δ [11]. Laccase genes within each group shared at least 97% sequence identity

and might represent just allelic variants. Several publications have described the utilization of mixtures of different *T. versicolor* laccases for degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorophenols and other phenolic compounds [12–15]. Besides that, C–C coupling of sinapic acid using a crude enzyme preparation of *T. versicolor* has also been reported [10,16,17]. However, a comparison of biochemical properties and enzymatic activities of purified laccases' isoenzymes from *T. versicolor* is still missing.

In the present work, we describe cloning, expression and comparative characterization of laccases from all four isoenzyme groups of *T. versicolor* concerning their biochemical properties, phenolic C–C coupling activity and oxidation efficiency towards PAHs.¹ Further we investigated the influence of the amino acid residues at positions 164 and 265 in the substrate binding sites on the activity of different laccases.

* Corresponding author. Fax: +49 711 685 3196.

E-mail address: itbvur@itb.uni-stuttgart.de (V.B. Urlacher).

¹ Abbreviations used: ABTS; 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid); PAHs, polycyclic aromatic hydrocarbons; BMM, buffered minimal medium; BMGY, buffered glycerol-complex medium; MTBE, methyl *tert*-butyl ether.

Material and methods

cDNA synthesis

RNA was isolated from a culture of *T. versicolor* 3086 (DSMZ, german collection of microorganisms). The fungus was grown in 20 ml synthetic medium [18] with 6.6 mg/l CuSO₄ at 28 °C and 150 rpm. After 7 days of growth the mycelium was harvested and RNA was isolated using the RNeasy Plant Mini Kit according to the manufacturer's instructions.

PCR primers for cDNA amplification of *lccα* were designed based on the sequence of *lcc1* (GenBank Accession No. AY693776) [11], for *lccβ* based on *lcc2* (GenBank Accession No. Y18012) [19], for *lccγ* based on *CVLG1* (GenBank Accession No. D84235) [20] and for *lccδ* based on *lcc1* (GenBank Accession No. X84683) [21]. The primer sequences are listed in Table 1. The first strand cDNA was synthesized from total RNA using SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) with oligo-dT primers and *Lccδ* reverse primer, respectively. Laccase genes were amplified from single-stranded cDNA using *Lccα*, *Lccβ*, *Lccγ* and *Lccδ* forward and reverse primers and the following PCR program: 94 °C (4 min, once), 94 °C (1 min), 60 °C (1 min), 72 °C (4 min), 40 cycles and 72 °C (4 min, once). PCR products of *lccα*, *lccβ* and *lccδ* were digested with HindIII and EcoRI, the PCR product of *lccγ* with HindIII and XhoI, respectively, cloned into pYES2 vector and sequenced.

The native signal peptides of the laccase genes were replaced by the α -mating factor signal peptide of *Saccharomyces cerevisiae* by overlap extension PCR. The α -mating factor signal peptide was amplified from the pPICZα vector with the α -factor forward and reverse primer. The laccase genes were amplified without the native signal peptide, but with an overlap to the 3' end of the α -mating factor signal peptide at the 5' end of the forward primers. The reverse primers were the same as described above with exception of *lccγ* reverse primer *Lccγ*. XbaI. The laccase genes and the α -mating factor signal peptide were fused by overlap extension PCR using the α -factor forward primer and the reverse primers described above (for *lccγ* *Lccγ*-XbaI). The PCR products were digested with HindIII and EcoRI (*lccα*, *lccβ*, *lccδ*) or with HindIII and XbaI (*lccγ*), cloned into pYES2 and sequenced.

Cloning into P. pastoris expression vector

The laccase genes were amplified by PCR from the pYES2 plasmids and cloned into pPICZA vector. For amplification of laccase genes with their native signal peptide *Lccα*-pPICZA, *Lccβ*-pPICZA, *Lccγ*-pPICZA and *Lccδ*-pPICZA forward primers were used. For amplification of laccase genes with the α -mating factor signal peptide the α -factor-pPICZA forward primer was applied. Reverse primers were the same as described above (for *lccγ* *Lccγ*-XbaI). PCR products were digested with *Bsp119I* and EcoRI (*lccα*, *lccβ*, *lccδ*) or with *Bsp119I* and XbaI (*lccγ*), ligated with the digested pPICZA vector and sequenced. *P. pastoris* X-33 cells were transformed with *PmeI* or *SacI* linearized plasmids or empty pPICZA vector according to the *Pichia* expression vectors manual (Invitrogen). Transformants were picked from YPDS plates supplemented with zeocin (100 µg/ml) and screened for production of laccase by transferring the colonies on minimal methanol plates containing

CuSO₄ (0.3 mM) and ABTS (0.2 mM). Transformants with the highest laccase production were identified by the largest green halo around *Pichia* colonies and used for further studies.

Site-directed mutagenesis

Construction of L164V and F265A mutants of *Lccβ* was performed using the Stratagene™ Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. Mutations were introduced using *Lccβ*-L164V and *Lccβ*-F265A forward and reverse primers.

Expression and fermentation of laccases

Pichia pastoris transformants were grown overnight in 10 ml buffered glycerol-complex medium (BMGY, 10 g yeast extract, 20 g peptone, 0.1 M sodium phosphate buffer pH 6.0, 100 ml of 10% (v/v) sterile glycerol and 0.04 mg/ml biotin) at 30 °C and 180 rpm. Overnight cultures were harvested by centrifugation (1500g, 10 min). The pellets were resuspended in 50 ml buffered minimal medium (BMM, 13.4 g YNB, 0.1 M sodium phosphate buffer pH 6.0, 0.5% (v/v) methanol, 0.04 mg/ml biotin and 0.1–0.6 mM CuSO₄) to an OD₆₀₀ of 1.0. *P. pastoris* transformants were cultivated at 17–30 °C and 180 rpm. Methanol (100%) was added daily (final concentration 0.5% (v/v)) to maintain induction. Samples were taken daily for spectrophotometric determination of cell growth and laccase activity.

The bioreactor cultivations were seeded with the content of shake flask cultures, growing over night at 30 °C and 180 rpm, up to an OD₆₀₀ of 0.5. Cultivations were performed in a 7.5 l reactor (Infors, Bottmingen, Switzerland) containing basal salt medium (5 l, 45.5 g K₂SO₄, 37.5 g MgSO₄ · 7H₂O, 31 g KOH, 2.35 g CaSO₄ · 2H₂O, 66.75 ml H₃PO₄ (85%), 250 g glycerol, 0.5 ml antifoam solution 286, 4.35 mg biotin and 1.5 ml PTM₁ trace salts (one litre PTM₁ contains 6 g CuSO₄ · 5H₂O, 0.08 g NaI, 3.0 g MnSO₄ · H₂O, 0.5 g CoCl₂, 20.0 g ZnCl₂, 0.02 g H₂BO₃, 0.2 g Na₂MoO₄ · 2H₂O, 65.0 g FeSO₄ · 7H₂O, 0.2 g biotin and 30 ml 6 N H₂SO₄). The fermentation temperature was 30 °C, after induction it was shifted to 25 °C or 18 °C. The pH was maintained at 5.0 using NH₄OH (28%) and H₃PO₄ (10%). The airflow was kept at 10 l/min and the stirrer speed was adjusted between 800 and 1000 rpm. When the initial methanol concentration (0.5% (v/v)) in the culture broth was depleted, indicated by an abrupt increase in dissolved oxygen, methanol solution (20 g, with 1.2% (v/v) PTM₁) was automatically added.

Protein purification

Culture supernatants of the fermentation processes containing the laccases were obtained by centrifugation of the culture broths (10800g, 25 min). The supernatants were concentrated 29-fold by cross-flow ultrafiltration using a Millipore set-up according to the manufacturer's instructions with a silicone membrane (Pall, East Hills, NY, USA) of 10 kDa cut-off value. Laccases were purified using hydrophobic interaction chromatography. Phenylsepharose HP (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) was equilibrated with 20 mM sodium acetate buffer (with 1.5 M (NH₄)₂SO₄, pH 5.0) (buffer A). A 10 ml sample (1:2.5 diluted and ammonium sulfate salted) was loaded onto the column at a linear flow rate of 5 ml/min. Afterwards, the column was washed with one column volume of buffer A. Laccases were eluted from the column with a step gradient using 20 mM sodium acetate buffer, pH 5.0. Fractions containing laccase activity were pooled. Next 0.5 ml of concentrated sample was applied on a Sephacryl S-300 HR gel filtration column (Amersham Biosciences) equilibrated with 20 mM sodium acetate buffer, pH 5.0. The chromatographies were performed at a flow rate of 0.25 ml/min. Fractions with laccase activity were pooled and concentrated using an Amicon ultrafiltration cell (Millipore, Billerica, MA, USA). Concentration of proteins was determined using Bradford assay [22]. Bovine serum albumin was used as a standard. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was done in a Minigel-Twin (Biometra, Goettingen, Germany). Proteins were visualised by silver staining.

Activity assays

Laccase activity was routinely assayed at room temperature using ABTS (0.5 mM) in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.0. Activity was measured by monitoring the change in absorption at 420 nm with an extinction coefficient of 36 mM⁻¹ cm⁻¹ [23]. One unit is defined as the amount of enzyme that oxidizes 1 µmol of substrate per minute. For activity measurements at various pH values, laccase activities were assayed in 0.1 M citrate phosphate buffer at pH values of 1.5–8.0. Stability of enzymes at pH 2.0, 3.0, 4.0 and 5.0 were determined by incubating laccase solutions (0.5 µM) in 0.1 M citrate phosphate buffer, pH 2.0–5.0 at room temperature for 24 h. After 1, 2, 3, 4, 5, 8, 15, 20 and 24 h samples were taken and ABTS oxidation activity was measured. For determination of ABTS oxidation activity at increased temperatures laccase activities were measured at various temperatures between 25 and 90 °C in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.0 for 5 min. For thermostability measurements, laccase solutions (0.5 µM) were incubated at 25, 40, 60 and 80 °C in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.0. After 20 min ABTS oxidation activity was determined at room temperature. Kinetic constants were determined in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.0 at room temperature. ABTS concentration was varied in range of 0.005–5 mM.

Table 1
Forward and reverse primer sequences used for amplification and site-directed mutagenesis of laccase genes

Name	Direction	Sequence
<i>Lccα</i>	Forward	CCATACAAGCTTATGGGTCTGCAGCGGTTTCAGCTTC
	Reverse	GGAGTGAATTCCTACTGCTCGGCCTCGCTC
<i>Lccβ</i>	Forward	CCATACAAGCTTATGTCGAGTTTCACTCTCTTCTCCG
	Reverse	GGATAGAATTCCTACTGCTCGGTCGGGTCGAG
<i>Lccγ</i>	Forward	CCATACAAGCTTATGGGCAAGTTTCACTCTTCGTGAAC
	Reverse	GGATAGAATTCCTCAGAGGTCGGACGAGTCCAAAG
<i>Lccγ</i> -XbaI	Reverse	CCTGTCTCTAGATCAGAGGTCGGACGAGTCCAAAG
<i>Lccδ</i>	Forward	CCATACAAGCTTATGGGCAAGTTTCACTCTCTCTCG
	Reverse	GGATAGAATTCCTAGAGGTCGGATGAGTCAAGAGCG
α -factor	Forward	CCATACAAGCTTATGAGATTTCTTCAATTTTACTGCTG
	Reverse	CAGCTTCAGCCTCTCTTTCTC
<i>Lccα</i> -pPICZA	Forward	CTAATTATTCGAAACGATGGGCTCGACGGGTTTCAGCTTC
<i>Lccβ</i> -pPICZA	Forward	CTAATTATTCGAAACGATGTCGAGGTTTCACTCTCTCTCGG
<i>Lccγ</i> -pPICZA	Forward	CTAATTATTCGAAACGATGGGCAAGTTTCACTCTCTCTCGTGAAC
<i>Lccδ</i> -pPICZA	Forward	CTAATTATTCGAAACGATGGGCAAGTTTCACTCTCTCTCGG
α -factor-pPICZA	Forward	CTAATTATTCGAAACGATGAGATTTCTTCAATTTTACTGCTG
<i>Lccβ</i> -L164V	Forward	CCGCAATTCCTGTGGGCGCCGACGCCAC
	Reverse	GTGGCGTCCGGCCACAGGGAATGCGG
<i>Lccβ</i> -F265A	Forward	GCCAACCCGAGCGGGTAACTCGGG
	Reverse	CCCGACGTTACCCCGCTCGGGTTGCG

C–C coupling of sinapic acid

All experiments were performed in 20 ml 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.0 with 0.05 U/ml of laccase. Sinapic acid (dissolved in 200 μ l DMSO) was added to a final concentration of 5 mM. Reactions were run at room temperature for 2 h. Reaction progress was followed by taking samples in course of reactions. Samples were acidified with 6 M HCl, extracted with ethyl acetate, evaporated, redissolved in acetonitrile and analysed by HPLC measurements. Control reactions were performed in the same manner but without laccase.

Oxidation of PAHs

All experiments were performed in 5 ml 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.0 with 2 U/ml of laccase. Fluorene, naphthalene and acenaphthene (dissolved in 50 μ l ethanol), acenaphthylene (dissolved in 100 μ l ethanol), phenanthrene and anthracene (dissolved in 15 μ l acetone), respectively, were added to a final concentration of 0.1 mM. ABTS was added to a final concentration of 1 mM. Reactions were run at room temperature for 72 h. Reaction mixtures were either extracted with methyl *tert*-butyl ether (MTBE) (reaction with fluorene and naphthalene) or with chloroform (reactions with phenanthrene, anthracene, acenaphthene and acenaphthylene) and analysed by GC/MS. Control reactions were performed in the same manner without laccase.

Synthesis of dehydrodisinapic acid dilactone

Sinapic acid (672 mg, 3 mmol) was dissolved in 45 ml dry methanol; the catalyst *N,N*-ethylenebis(salicylideneaminato)cobalt(II) (49 mg, 0.15 mmol) was added and the mixture stirred at room temperature for 4 h while bubbling a slow stream of oxygen through the solution. The resulting beige solid was collected by filtration, the remaining solution concentrated in vacuum and cooled to 0 °C. The additional precipitate was collected and the combined solids were suspended in 30 ml methanol. The suspension was heated to reflux for 30 min. After cooling to 0 °C, the crude product was collected by filtration and washed with 30 ml cold methanol. After drying, (3RS,3ARS,6RS,6ARS)-tetrahydro-3,6-bis(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-1H,4H-furo[3,4-*c*]furan-1,4-dione; dehydrodisinapic acid dilactone) (407 mg, 61%) was obtained. The structure was confirmed by ¹H NMR measurements (300 MHz, [D₆]CD₃COCD₃): δ = 3.88 (s, 12H, 4 OMe), 4.15 (s, 2H, 3a-H and 6a-H), 5.80 (s, 2H, 3-H and 6-H), 6.78 (s, 4H, 4 arom. H), 7.52 (s, 2H, 2 OH).

HPLC analysis

Educts and products of the C–C coupling reactions were analysed by HPLC (SIL-10HTA with a DAD detector, Shimadzu, Kyoto, Japan) using a Chromolith Performance RP-18e column (100–4.6 mm). Compounds were monitored by UV absorption (absorption spectra were recorded in range of 190–400 nm). For analysis, a gradient of solvents A/B (solvent A: 0.01% (v/v) trifluoroacetic acid; solvent B: acetonitrile) was used as follows: from 25% (v/v) of solvent B to 40% (v/v) of solvent B in 12 min. The flow rate of the mobile phase was 1 ml/min. Prior to a new injection, the column was equilibrated at initial conditions for 6 min. Educt and product of the reactions were identified by comparison of the retention times and UV spectra with that of standards of sinapic acid and the synthesized dehydrodisinapic acid dilactone. Additionally, the structure of educt and product of the reaction was confirmed by NMR measurements. Concentration of sinapic acid was calculated from peak areas of standard samples at different concentrations (0–5 mM) from HPLC chromatograms.

GC/MS analysis

Samples from oxidation reactions of PAHs were analysed by GC/MS (GC–MS–QP2010, Shimadzu) equipped with a FS-Supreme column (30 m, internal diameter 0.25 mm, film thickness 0.25 μ m) using helium as carrier gas at linear velocity of 30 cm/s. Detection was performed by the single-ion monitoring mode or by scanning within a range of 50–450 *m/z*. The following GC programs were used: fluorene: 160 °C 2 min iso, 5 °C/min, 210 °C; anthracene: 200 °C 3 min iso, 20 °C/min, 280 °C; phenanthrene: 195 °C 2.2 min iso, 25 °C/min, 300 °C; naphthalene: 110 °C 1.5 min iso, 10 °C/min, 200 °C; acenaphthene and acenaphthylene: 150 °C 2.5 min iso, 15 °C/min, 310 °C. Identification of compounds was achieved by comparison of retention times and mass spectra with standards.

Results

Cloning and expression of laccases

For amplification of four laccase genes (*lcc*) belonging to the four laccase isoenzyme groups of *T. versicolor*, α , β , γ and δ , total RNA, isolated from the culture of *T. versicolor* 3086, was used for

synthesis of single-stranded cDNA. Amplification of *lcc* α , *lcc* β , *lcc* γ and *lcc* δ from the obtained cDNA was performed using specific primers based on reported sequences of *lcc1* [11] for *lcc* α , *lcc2* [19] for *lcc* β , *CVLG1* [20] for *lcc* γ and *lcc1* [21] for *lcc* δ . After cloning of the laccases into *S. cerevisiae* expression vector pYES2 either with their native signal peptides or with the α -mating factor signal peptide of *S. cerevisiae*, the sequences were confirmed by sequencing. The cloned laccases shared protein sequence identity of 67–77%.

Due to very low expression levels of the laccases in *S. cerevisiae* (data not shown) corresponding genes were cloned into *P. pastoris* expression vector pPICZA under control of the *AOX1* promoter. The resulting plasmids were inserted into *P. pastoris* X-33 cells. The effect of the signal peptide on laccases' expression level has been studied in minimal medium at different copper concentrations (0.1–0.6 mM) and various expression temperatures (17–30 °C). Generally, addition of 0.3 mM CuSO₄ resulted in highest volumetric laccase activities independently on other expression parameters. Highest volumetric activity of *Lcc* α (42 mU/ml towards ABTS) was obtained at 25 °C when the α -mating factor signal peptide was used for secretion instead of the native signal peptide. Optimal *Lcc* β production (105 mU/ml) was observed at 25 °C with its native signal peptide. For both, *Lcc* γ and *Lcc* δ , 18 °C was more preferable than 25 °C, resulting in approximately 4-fold higher volumetric laccase activity. With the native signal peptide up to 6 mU/ml of *Lcc* γ were obtained, while highest volumetric activity of *Lcc* δ of 24 mU/ml was reached when the α -mating factor signal peptide was used for laccase secretion. No laccase activity could be detected in *Pichia* cultures with empty pPICZA vector.

To obtain higher protein amounts for further characterization, fed-batch fermentations of *P. pastoris* expressing *lcc* α , *lcc* β , *lcc* γ or *lcc* δ were performed under conditions optimized for shake flasks. After 12 to 16 days of fermentation, volumetric activities in the medium have reached 820 U/l (8.7 U/g cell dry weight (cdw)) for *Lcc* α , 3400 U/l (28.3 U/g cdw) for *Lcc* β , 1280 U/l (8.5 U/g cdw) for *Lcc* γ and 1550 U/l (10 U/g cdw) for *Lcc* δ .

Purification and biochemical characterization of recombinant laccases

For purification of the recombinant laccases from culture medium hydrophobic interaction chromatography followed by size exclusion chromatography was applied. The purified laccases migrated as single bands on SDS–polyacrylamide gel at a molecular mass of 72 kDa. The difference of the apparent molecular masses with estimated ones (54 kDa) is probably due to hyperglycosylation of the proteins in *P. pastoris*. Because the apparent as well as estimated molecular masses of all four laccases are similar, it can be assumed, that the carbohydrate content of all four proteins is equal. Thus, the four laccases seem to be glycosylated to the same extent. The specific activities of the enzymes (determined with ABTS assay) are summarized in Table 2.

Table 2
Comparison of biochemical properties of recombinant *Lcc* α , *Lcc* β , *Lcc* γ and *Lcc* δ

	Specific activity ^a (U/mg)	pH optimum ^b	Temperature optimum ^c (°C)
<i>Lcc</i> α	2.6	1.9	75
<i>Lcc</i> β	24.5	2.3	80
<i>Lcc</i> γ	36.3	3.1	60
<i>Lcc</i> δ	9.9	3.1	45

^a Specific activity of laccases towards ABTS was determined in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.0 at room temperature.

^b pH optimum was determined with ABTS as substrate in 0.1 M citrate phosphate buffer at pH values of 1.5–8.0 at room temperature.

^c Temperature optimum of laccases was determined by measuring laccase activities towards ABTS at various temperatures between 25 °C and 90 °C in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.0 for 5 min.

The pH optimum of the laccases, determined in 0.1 M citrate phosphate buffer pH 1.5–8.0 using ABTS as substrate, was in between 1.9 (Lcc α) and 3.1 (Lcc γ and Lcc δ) (Table 2). Stabilities of the laccases at such low pH values were, however, quite low (Fig. 1). Residual activities of the laccases after 24 h incubation at pH 2.0 reached 35% or even less. Both, Lcc α and Lcc β were quite stable at pH 3.0–5.0 within 20 h (85–95% residual activity). Stability of Lcc γ subsequently decreased with lowering pH value. Lcc δ was completely inactivated already at pH 3.0 after 3 h. Highest stability of laccases was found at pH 5.0. After 24 h incubation at pH 5.0 Lcc α showed 90.7% residual activity, Lcc β 87%, Lcc γ 76% and Lcc δ 36%.

In general, laccases-catalyzed ABTS oxidation was stimulated at elevated temperatures. However, while Lcc α and Lcc β demonstrated their best activities at 75 and 80 °C respectively, highest ABTS oxidation rate for Lcc γ and Lcc δ was observed at much lower temperatures (Table 2). This is probably due to differences in thermal stabilities of the laccases. Thermal stability was investigated after 20 min incubation of enzymes at pH 5.0 at elevated temperatures between 40 and 80 °C. Lcc α retained almost complete activity after incubation at 40, 50 and 60 °C, but lost 75% of its initial activity at 70 °C (Fig. 2). Activity of Lcc γ decreased to 14% at 60 °C. Lcc δ demonstrated only 40% residual activity after incubation at 40 °C and was completely inactive after incubation at 50 °C. Highest stability at elevated temperatures was found for Lcc β (62% residual activity at 70 °C).

Kinetic parameters of the laccases were determined with ABTS as substrate and summarized in Table 3. Remarkably, four homologous laccases demonstrated different substrate affinities and turnover rates (k_{cat}). Lcc γ and Lcc δ showed higher turnover rates than Lcc α and Lcc β , and the latter ones had significantly lower K_M values.

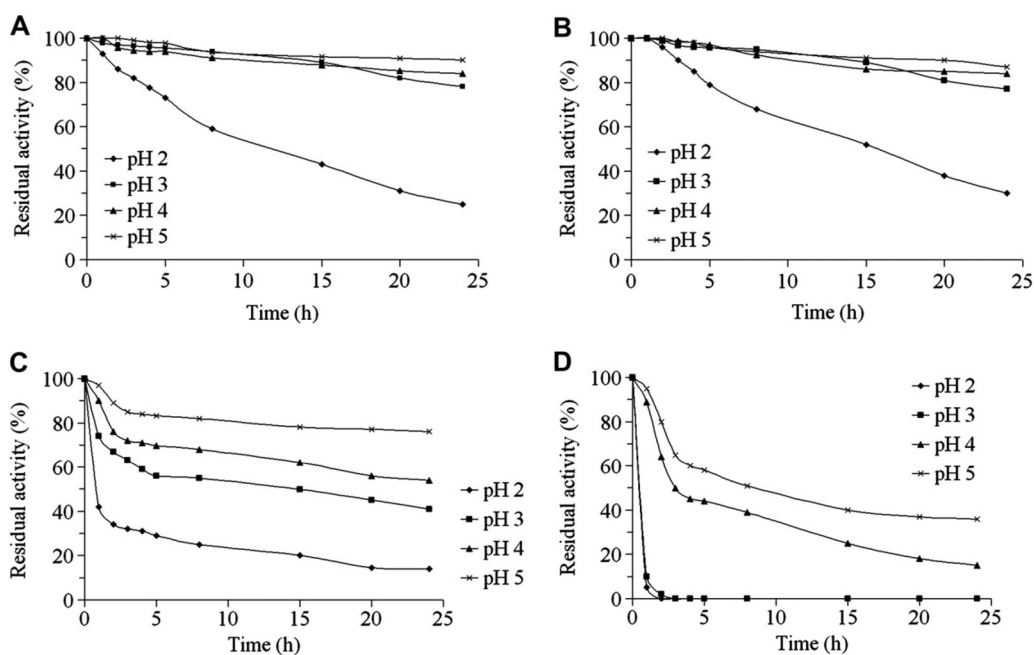


Fig. 1. Stabilities of recombinant laccases in 0.1 M citrate phosphate buffer at different pH values at room temperature. (A) Lcc α , (B) Lcc β , (C) Lcc γ , (D) Lcc δ . Activity was determined with ABTS as substrate. The activities were normalized to the initial activity at pH 2.0, 3.0, 4.0 and 5.0, respectively before the incubation.

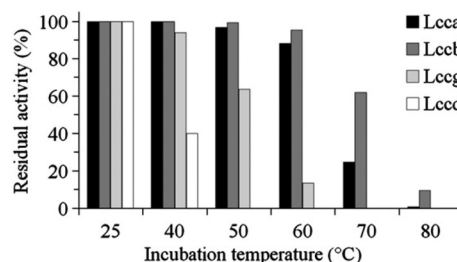


Fig. 2. Thermal stability of recombinant laccases, determined after 20 min incubation at various temperatures in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.0. Residual activity was determined at room temperature with ABTS as substrate. The residual activities were normalized to the initial activities of the laccases at 25 °C, taken as 100 %.

Table 3
Comparison of kinetic parameters of recombinant Lcc α , Lcc β , Lcc γ and Lcc δ

	K_M (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M
Lcc α	22 \pm 2	55 \pm 5	2.5
Lcc β	88 \pm 6	203 \pm 12	2.3
Lcc γ	359 \pm 11	647 \pm 32	1.8
Lcc δ	2262 \pm 103	798 \pm 44	0.3

Activity was determined with ABTS as substrate in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.0 at room temperature.

C–C coupling of sinapic acid

The four recombinant laccases were able to catalyze oxidative C–C coupling of sinapic acid to (3RS,3aRS,6RS,6aRS)-tetrahydro-3,6-bis(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-1H,4H-furo[3,4-c]furan-

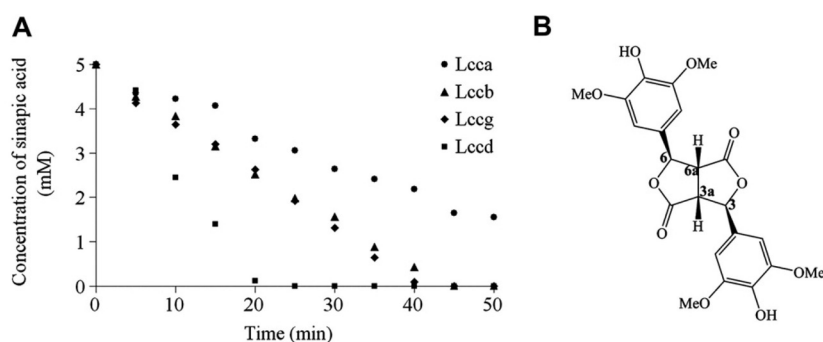


Fig. 3. (A) Reaction progress of the conversion of sinapic acid by recombinant *Lcc α* , *Lcc β* , *Lcc γ* and *Lcc δ* to (3*RS*,3*aRS*,6*RS*,6*aRS*)-tetrahydro-3,6-bis(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-1*H*,4*H*-furo[3,4-*c*]furan-1,4-dione (dehydrodisinapic acid dilactone) (B), the main product of the reaction.

1,4-dione (dehydrodisinapic acid dilactone) [10], but showed different activities in this reaction (Fig. 3). *Lcc δ* showed highest activity towards sinapic acid. After 20 min 98% conversion was achieved and about 18 mg of the crude product was isolated. Activities of *Lcc β* and *Lcc γ* towards sinapic acid were similar, but lower as compared with *Lcc α* . Lowest activity was found with *Lcc δ* . In this case, 98% conversion of sinapic acid was achieved after 90 min. No product formation was observed in the control reactions without laccase.

Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)

Six PAHs have been tested as substrates: naphthalene, fluorene, anthracene, phenanthrene, acenaphthene and acenaphthylene (Fig. 4). Oxidation efficiency and products were analyzed after 72 h by GC/MS. Highest activity was found with *Lcc β* . After 72 h 45% conversion of fluorene by *Lcc β* was achieved. Two oxidation products were identified by GC/MS, fluorenol and fluorenone at a ratio of 1:1. Furthermore, *Lcc β* oxidized acenaphthene to a single product 1-acenaphthol (50% conversion) and acenaphthylene to 1,8-naphthalic acid anhydride (18% conversion). *Lcc α* was able to oxidize fluorene, acenaphthene and acenaphthylene in the same manner as *Lcc β* , but with much lower efficiency (30% conversion of fluorene, 20% of acenaphthene, and only 10% of acenaphthylene). None of the four laccases was able to oxidize anthracene, naphthalene or phenanthrene. *Lcc γ* oxidized only acenaphthene with a very low activity (15% conversion), while *Lcc δ* did not oxidize any of the PAHs tested.

Oxidation of PAHs was significantly improved by addition of ABTS (Fig. 5). In the presence of ABTS, conversion of fluorene by *Lcc β* increased from 45% to 82%, and by *Lcc α* from 30% to 50%. Oxidation of fluorene was also observed with *Lcc γ* and *Lcc δ* , but with

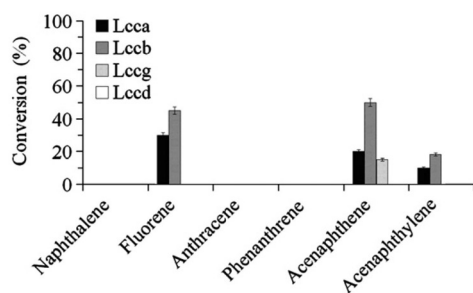


Fig. 4. Conversion of various PAHs by recombinant *Lcc α* , *Lcc β* , *Lcc γ* and *Lcc δ* .

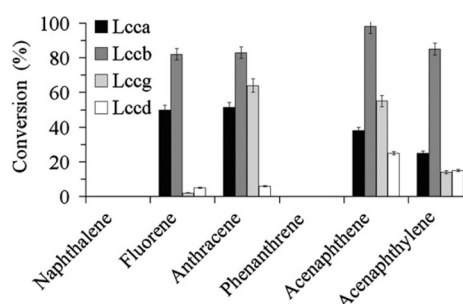


Fig. 5. Conversion of various PAHs by recombinant *Lcc α* , *Lcc β* , *Lcc γ* and *Lcc δ* in the presence of 1 mM ABTS.

very low activity. In the presence of ABTS nearly 100% conversion of acenaphthene by *Lcc β* could be achieved. The oxidation products of this reaction were identified as 1-acenaphthol, 1,2-acenaphthenequinone and 1,8-naphthalic acid anhydride, at a ratio of 1:3:6. Surprisingly, 1,2-acenaphthenequinone could not be detected in the reaction with *Lcc α* . Acenaphthene was oxidized by *Lcc α* to 1-acenaphthol and 1,8-naphthalic acid anhydride at a ratio of 3:1. Conversion of acenaphthylene by *Lcc β* could be strongly improved from 18% to 85% by addition of ABTS. The oxidation products of this reactions were identified as 1,2-acenaphthenequinone and 1,8-naphthalic acid anhydride at a ratio of 1:3:3. Conversion of acenaphthylene by the other laccases was much lower compared to *Lcc β* . Only one oxidation product, 1,8-naphthalic acid anhydride, was obtained from the oxidation of acenaphthylene by *Lcc α* (25% conversion). Anthracene, which was not converted by any laccase in the absence of ABTS, has been oxidized to 9,10-anthraquinone by all four laccases after ABTS addition. Highest conversion of anthracene (83%) was observed in reactions with *Lcc β* . Oxidation of naphthalene and phenanthrene by the laccases was not observed also after addition of ABTS. No product formation was observed in control reactions without laccase.

Site-directed mutagenesis of *Lcc β*

For investigation of the structural basis of the observed different activities of the laccases, four homology models were built on the basis of the crystal structure of TvL, a laccase from *T. versicolor* [24]. Residues, important for substrate binding (Asp206), Cu-Type 1 coordination (His458) and hydrophobic protein-ligand interaction (Phe162) are highly conserved in all four laccases (Fig. 6). Although homology models are very similar, some differences in the binding

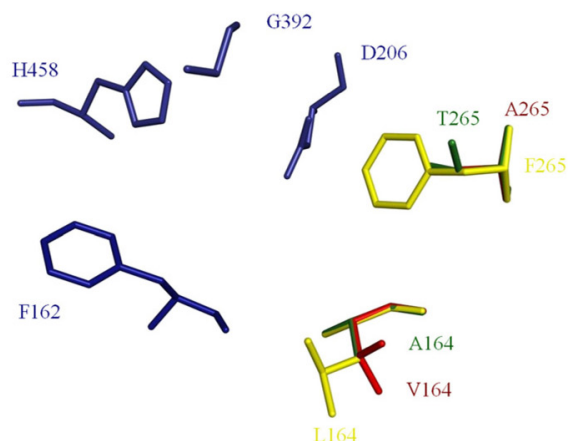


Fig. 6. View of the binding sites of the *T. versicolor* laccases. Identical side chains of the laccases are shown in blue. Side chains of *Lccα* and *Lccβ* are shown in yellow, of *Lccγ* in green and of *Lccδ* in red. The figure was drawn with Pymol.

sites of the laccases could be identified. For example, amino acid residues at positions 164 and 265, also contributing in substrate binding, are not conserved. Both, *Lccα* and *Lccβ* showing higher PAHs oxidation activity compared to *Lccδ*, have the bulky phenylalanine at position 265. *Lccδ* has a much smaller alanine at this position, which results in a broader substrate binding site. The leucine 164 in both, *Lccα* and *Lccβ* is replaced by valine in *Lccδ*. Thus, a larger substrate binding site of *Lccδ* might enable a better binding and faster dimerization of sinapic acid. On the other hand, the binding site of *Lccδ* may be too large for the efficient binding of PAHs, which is reflected by much lower activities compared to *Lccα* and *Lccβ*. In *Lccγ* Ala164 also enlarges the cavity, but Thr265 may prevent essential hydrophobic interactions between sinapic acid and the laccase, resulting in lower activity towards sinapic acid than that of *Lccδ*. However, in terms of PAHs oxidation substrate binding seems to be more efficient with Thr265 than Ala265, which was confirmed by higher activity of *Lccγ* compared to *Lccδ* in these reactions. The influence of the amino acid residues at positions 164 and 265 on substrate binding and stabilization was investigated by site-directed mutagenesis. Leu164 and Phe265 in *Lccβ* were replaced by valine and alanine, respectively, mimicking the substrate binding site of *Lccδ*. It was expected that C–C coupling activity of *Lccβ* will be improved, while PAH oxidation activity will be reduced. Three different mutants *Lccβ*_L164V, *Lccβ*_F265A and *Lccβ*_L164V_F265A have been constructed and expressed in *P. pastoris* in shake flasks. Activity of the mutants towards sinapic acid and anthracene (with addition of ABTS) was investigated (Table 4). Anthracene was selected as substrate, because *Lccβ* showed very high and *Lccδ*, by contrast, very low activity towards this compound. Both mutations have, however, almost no effect on C–C coupling activity. The *Lccβ*_L164V mutant showed

only a slight increase in activity towards sinapic acid (52% conversion after 20 min), while *Lccβ*_F265A showed even a slight decrease (47%) compared to *Lccβ* (50%). Surprisingly, activity of *Lccβ*_L164V_F265A towards sinapic acid was obviously lower (40%) than of *Lccβ*. On the other hand, oxidation of anthracene was clearly affected by both mutations, L164V and F265A. The mutant *Lccβ*_L164V resulted in the lowest conversion of anthracene (8%), which was comparable with *Lccδ* (6%). Oxidation of anthracene by *Lccβ*_F265A (13%) and *Lccβ*_L164V_F265A (15%) was slightly higher than of *Lccβ*_L164V, however much lower compared to *Lccβ* wild type (83%).

Discussion

Although extensive studies on laccase mixtures from *T. versicolor* concerning potential industrial applications have been done so far and some laccases from this fungus have been expressed in several recombinant hosts [11,19–21,25–29], a comparative characterization of the individual laccases of this fungus is still missing. Therefore we cloned, expressed and characterized four laccases belonging to different isoenzyme groups found in *T. versicolor* [11] concerning their oxidizing and C–C coupling activity. Recombinant expression and secretion of laccases in *P. pastoris* were highly affected by cultivation temperature and signal peptide used, which is consistent with literature data [19,27]. The volumetric activities of *Lccα* and *Lccβ* in fed-batch fermentations of *P. pastoris* were significantly higher than reported so far [25,27], providing the opportunity to apply isolated laccases in technical processes.

Fungal laccases often possess pH optima in acidic pH ranges corresponding to their environmental conditions [30–32]. Although highest ABTS oxidizing activity of *T. versicolor* laccases was observed at very low pH values of 1.9–3.1, all isoenzymes remained mostly stable at pH 5.0, according to the pH value of the natural environment of *T. versicolor*. Similar pH optimum and pH stability were found for *Lccα* and *Lccβ*, as well as for *Lccγ* and *Lccδ*. Thermal stabilities of laccases, in general, vary in the range between 30 and 50 °C, depending on their origin [33–35]. The four laccases from mesophilic *T. versicolor* lost sequentially their activity upon increasing temperature, but to a different extent. *Lccα* and *Lccβ* were much more stable at elevated temperatures as well as at room temperature, compared to *Lccγ* and *Lccδ*. Furthermore, K_M and k_{cat} values of *Lccα* and *Lccβ* were in good agreement with results found in the literature for other fungal laccases [11,36], however much lower compared to the parameters measured for *Lccγ* and *Lccδ*. No comparable kinetic data are available for *Lccγ* and *Lccδ*, but high K_M values for ABTS have already been published for other laccases [37].

From these findings, it is obvious that *Lccα* and *Lccβ* possess similar biochemical properties, obviously different from *Lccγ* and *Lccδ*. Hyperglycosylation in *P. pastoris* cannot contribute to the observed different biochemical properties of the laccases, as they are glycosylated to the same extent. This is to our knowledge the first report showing the possibility to classify the four different laccases from *T. versicolor* in distinct groups regarding their biochemical properties.

Regarding their enzymatic properties these four laccases can also be strictly distinguished. Lacki et al. reported C–C coupling of sinapic acid catalyzed by a crude phenol oxidase preparation from *T. versicolor* [10]. From our results, it can be assumed that the described preparation contain laccases, since we obtained the same main product, as described by the authors. Generally, activities of the isolated homologous laccases towards sinapic acid were rather high, but quite different. *Lccδ* showed highest and *Lccα* lowest activity in this reaction. Also with respect to oxidation of PAHs the investigated laccases demonstrated a very

Table 4

Conversion of sinapic acid and anthracene with *Lccδ*, *Lccβ*, *Lccβ*_L164V, *Lccβ*_F265A and *Lccβ*_L164V_F265A

	Sinapic acid conversion after 20 min (%)	Anthracene conversion after 72 h (%)
<i>Lccδ</i>	100	6
<i>Lccβ</i>	50	83
<i>Lccβ</i> _L164V	52	8
<i>Lccβ</i> _F265A	47	13
<i>Lccβ</i> _L164V_F265A	40	15

different behaviour. Highest activity towards PAHs was observed with Lcc β , whereas Lcc δ showed very low activity even after addition of a mediator, though being most active during C–C coupling of sinapic acid. In general, activity of laccases towards fluorene, acenaphthene and acenaphthylene could be strongly improved by addition of the mediator ABTS, as described in the literature [13,38]. Moreover, anthracene was oxidized only in the presence of ABTS. Generally, for applications that target large, insoluble, or non-natural substrates, small redox-active mediators have been found very useful in enhancing or extending laccase catalysis. Any reducing substrate of laccases having a higher redox potential and a relatively stable oxidized state may serve as a potential mediator, capable of being oxidized or reoxidized by laccase and oxidizing target molecules. There are two proposed mechanisms of ABTS-mediated substrate oxidation in the laccase-catalyzed reactions. It has been suggested that ABTS may act as a diffusible electron carrier [39], abstracting electrons from substrates, which are too large to access the enzyme active site. On the other hand, it was assumed to act as a co-oxidant [40], enabling oxidation of the aromatic substrates by increasing the redox potential of the laccase. The latter hypothesis is more consistent with our results, since different laccases converted the same PAHs with different activities even in the presence of the same amount of ABTS. Furthermore, different laccases resulted in different products or product distributions. For example, during conversion of acenaphthene and acenaphthylene by Lcc α no 1,2-acenaphthenequinone could be detected, although this compound was identified in all other product mixtures. Moreover, naphthalene and phenanthrene could not be oxidized by any of the laccases also in the presence of ABTS, which is consistent with previously reported data [12]. Using the Lcc β -ABTS system higher activities towards anthracene, acenaphthene and acenaphthylene have been achieved compared to those reported for *T. versicolor* laccase mixtures with ABTS [13,38].

Further we investigated the structural basis of the observed different activities of the four laccases and identified two positions in the substrate binding site (164 and 265), which are not highly conserved among the studied enzymes. Lcc δ with a high C–C coupling activity has valine at position 164 and alanine at position 265. In order to investigate the effect of these positions on C–C coupling activity and oxidation of PAHs, Leu164 and Phe265 of Lcc β , which has lower C–C coupling activity and higher PAH oxidizing activity than Lcc δ , were replaced by valine and alanine, respectively. While C–C coupling activity was not significantly affected by these mutations, oxidation activity of Lcc β towards anthracene was strongly reduced by the single mutations L164V and F265A, as well as by both mutations together. This indicates that these positions, in fact, contribute to binding and stabilization of bulky hydrophobic aromatic compounds like PAHs in the substrate binding site. Further work will focus on detailed characterization of the constructed mutants as well as on investigation of other mutations at positions 164 and 265 on laccase activity.

In conclusion, availability of isolated isoenzymes from *T. versicolor* gives the possibility to choose the laccase with desired activity and substrate specificity. From our results the more stable laccase Lcc β seems to be most appropriate for bioremediation of PAHs, while Lcc δ is a preferable enzyme for chemical synthesis.

Acknowledgments

This work was financially supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 706), the Ministerium für Wissenschaft, Forschung und Kunst des Landes Baden-Württemberg and the Fonds der Chemischen Industrie.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.abb.2008.03.009.

References

- [1] B. Reinhammar, B.G. Malstrom, in: L. Lontie (Ed.), Copper Proteins and Copper Enzymes, CRC Press Inc., Boca Raton, Fla, 1981, pp. 1–35.
- [2] H. Claus, Arch. Microbiol. 179 (2003) 145–150.
- [3] R. Bourbonnais, M.G. Paice, FEBS Lett. 267 (1990) 99–102.
- [4] A.J. Clutterbuck, J. Gen. Microbiol. 70 (1972) 423–435.
- [5] J.P. Geiger, M. Nicole, D. Nandris, B. Rio, Eur. J. Forest Pathol. 16 (1986) 22–37.
- [6] D.M. Omalley, R. Whetten, W.L. Bao, C.L. Chen, R.R. Sederoff, Plant J. 4 (1993) 751–757.
- [7] C.F. Thurston, Microbiol. 140 (1994) 19–26.
- [8] H. Uchida, T. Fukuda, H. Miyamoto, T. Kawabata, M. Suzuki, T. Uwajima, Biochem. Biophys. Res. Commun. 287 (2001) 355–358.
- [9] H. Uyama, S. Kobayashi, Curr. Org. Chem. 7 (2003) 1387–1397.
- [10] K. Lacki, Z. Duvnjak, Biotechnol. Bioeng. 57 (1998) 694–703.
- [11] R. Necochea, B. Valderrama, S. Diaz-Sandoval, J.L. Folch-Mallol, R. Vazquez-Duhalt, G. Iturriaga, FEMS Microbiol. Lett. 244 (2005) 235–241.
- [12] A. Majcherzyk, C. Johannes, A. Huttermann, Enzyme Microb. Tech. 22 (1998) 335–341.
- [13] C. Johannes, A. Majcherzyk, A. Huttermann, Appl. Microbiol. Biotechnol. 46 (1996) 313–317.
- [14] M.A. Ullah, C.T. Bedford, C.S. Evans, Appl. Microbiol. Biotechnol. 53 (2000) 230–234.
- [15] H. Kadhim, C. Graham, P. Barratt, C.S. Evans, R.A. Rastall, Enzyme Microb. Tech. 24 (1999) 303–307.
- [16] K. Lacki, Z. Duvnjak, Biotechnol. Bioeng. 51 (1996) 249–259.
- [17] K. Lacki, Z. Duvnjak, J. Chem. Technol. Biot. 65 (1996) 211–220.
- [18] G. Fahraeus, B. Reinhammar, Acta Chem. Scand. 21 (1967) 2367–2378.
- [19] P. Cassland, L.J. Jonsson, Appl. Microbiol. Biotechnol. 52 (1999) 393–400.
- [20] J. Mikuni, N. Morohoshi, FEMS Microbiol. Lett. 155 (1997) 79–84.
- [21] L.J. Jonsson, M. Saloheimo, M. Penttila, Curr. Genet. 32 (1997) 425–430.
- [22] M.M. Bradford, Anal. Biochem. 72 (1976) 248–254.
- [23] R.E. Childs, W.G. Bardsley, Biochem. J. 145 (1975) 93–103.
- [24] K. Piontek, M. Antorini, T. Choinowski, J. Biol. Chem. 277 (2002) 37663–37669.
- [25] C. Bohlin, L.J. Jonsson, R. Roth, W.H. van Zyl, Appl. Biochem. Biotechnol. 129–132 (2006) 195–214.
- [26] M.A. Brown, Z.W. Zhao, A.G. Mauk, Inorg. Chim. Acta 331 (2002) 232–238.
- [27] J. O'Callaghan, M.M. O'Brien, K. McClean, A.D.W. Dobson, J. Ind. Microbiol. Biot. 29 (2002) 55–59.
- [28] E. Ong, W.B.R. Pollock, M. Smith, Gene 196 (1997) 113–119.
- [29] A. Tellez-Jurado, A. Arana-Cuenca, A.E.G. Becerra, G. Viniestra-Gonzalez, O. Loera, Enzyme Microb. Tech. 38 (2006) 665–669.
- [30] P. Hoffmann, K. Esser, Arch. Microbiol. 112 (1977) 111–114.
- [31] A.M. Garzillo, M.C. Colao, V. Buonocore, R. Oliva, L. Falcigno, M. Saviano, A.M. Santoro, R. Zappala, R.P. Bonomo, C. Bianco, P. Giardina, G. Palmieri, G. Sannia, J. Protein Chem. 20 (2001) 191–201.
- [32] F. Xu, J. Biol. Chem. 272 (1997) 924–928.
- [33] F. Xu, W.S. Shin, S.H. Brown, J.A. Wahleithner, U.M. Sundaram, E.I. Solomon, BBA Protein Struct. M. 1292 (1996) 303–311.
- [34] D.A. Wood, J. Gen. Microbiol. 117 (1980) 327–338.
- [35] M. Heinzkill, L. Bech, T. Halkier, P. Schneider, T. Anke, Appl. Environ. Microbiol. 64 (1998) 1601–1606.
- [36] T. Bertrand, C. Jolivald, P. Briozzo, E. Caminade, N. Joly, C. Madzak, C. Mougins, Biochemistry 41 (2002) 7325–7333.
- [37] D.M. Soden, J. O'Callaghan, A.D.W. Dobson, Microbiology 148 (2002) 4003–4014.
- [38] C. Johannes, A. Majcherzyk, A. Huttermann, J. Biotechnol. 61 (1998) 151–156.
- [39] R. Bourbonnais, M.G. Paice, I.D. Reid, P. Lanthier, M. Yaguchi, Appl. Environ. Microbiol. 61 (1995) 1876–1880.
- [40] A. Potthast, T. Rosenau, C.L. Chen, J.S. Gatzl, J. Org. Chem. 60 (1995) 4320–4321.

3.1.1. Supplementary material

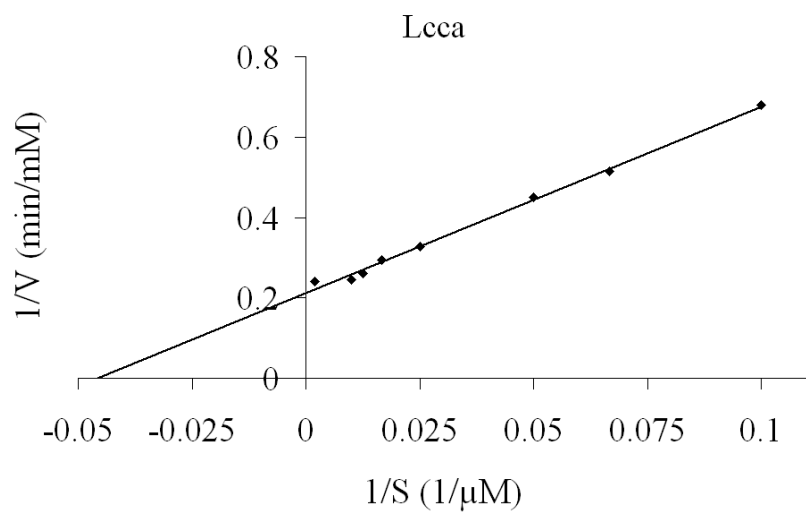


Figure. 7. Lineweaver-Burke plot of activity of Lcca at different ABTS concentrations.

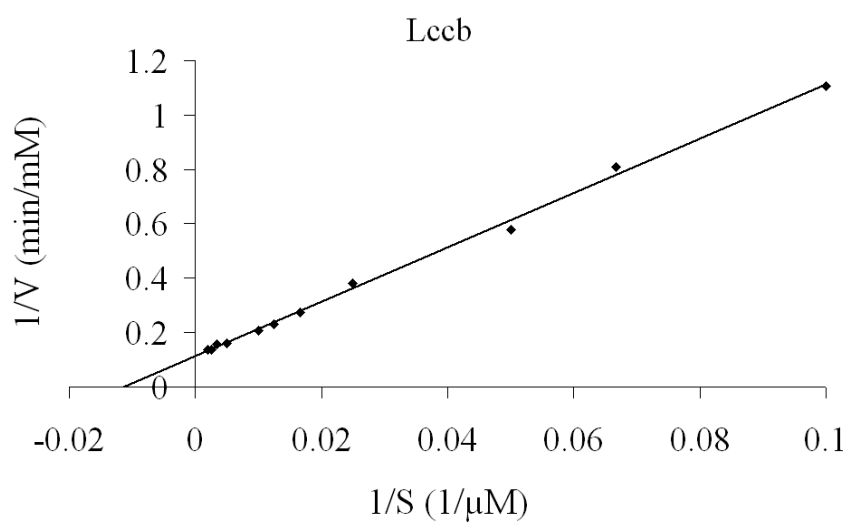


Figure. 8. Lineweaver-Burke plot of activity of Lccb at different ABTS concentrations.

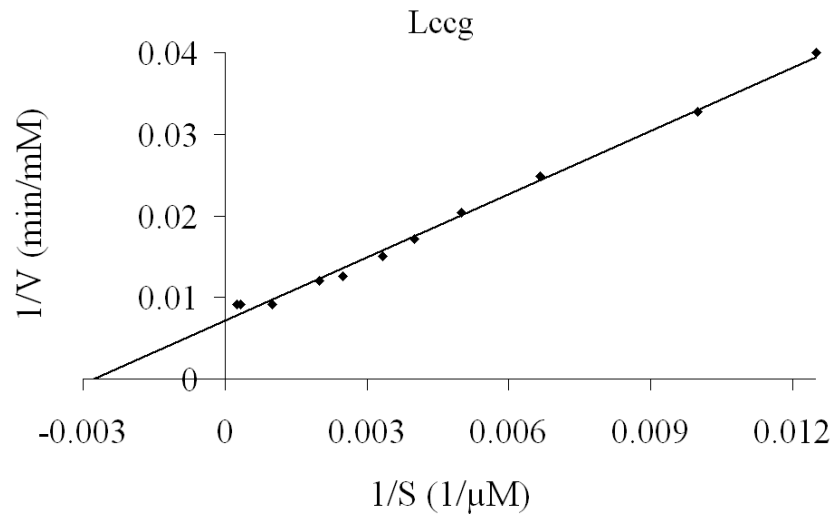


Figure. 9. Lineweaver-Burke plot of activity of Lcc γ at different ABTS concentrations.

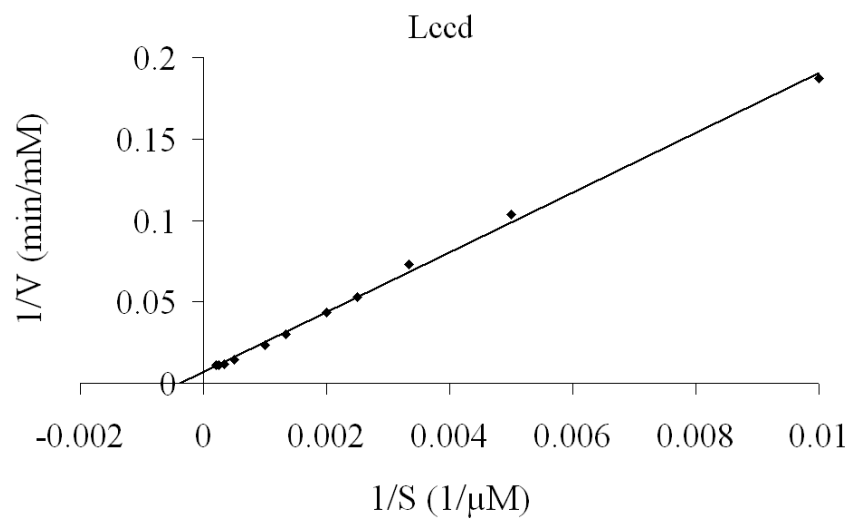


Figure. 10. Lineweaver-Burke plot of activity of Lcc δ at different ABTS concentrations.

3.2. Cloning and characterization of a new laccase from *Bacillus licheniformis* catalyzing dimerization of phenolic acids

Katja Koschorreck¹, Sven M. Richter¹, Augusta B. Ene², Emil Roduner², Rolf D. Schmid¹ and Vlada B. Urlacher¹

¹Institute of Technical Biochemistry, University of Stuttgart, D-70569 Stuttgart, Germany,

²Institute of Physical Chemistry, University of Stuttgart, D-70569 Stuttgart, Germany

Corresponding author: Vlada B. Urlacher; Tel: +49 711 68564523, Fax: +49 711 68563196, E-mail: Vlada.Urlacher@itb.uni-stuttgart.de

3.2.1. Abstract

A new laccase gene (*cotA*) was cloned from *Bacillus licheniformis* and expressed in *Escherichia coli*. The recombinant protein CotA was purified and showed spectroscopic properties, typical for blue multicopper oxidases. The enzyme has a molecular weight of ~65 kDa and demonstrates activity towards canonical laccase substrates 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS), syringaldazine (SGZ) and 2,6-dimethoxyphenol (2,6-DMP). Kinetic constants K_M and k_{cat} for ABTS were of $6.5 \pm 0.2 \mu\text{M}$ and 83 s^{-1} , for SGZ of $4.3 \pm 0.2 \mu\text{M}$ and 100 s^{-1} and for 2,6-DMP of $56.7 \pm 1.0 \mu\text{M}$ and 28 s^{-1} . Highest oxidizing activity towards ABTS was obtained at 85°C. However, after 1 h incubation of CotA at 70°C and 80°C a residual activity of 43% and 8% respectively, was measured. Furthermore, oxidation of several phenolic acids and one non-phenolic acid by CotA was investigated. CotA failed to oxidize coumaric acid, cinnamic acid and vanillic acid, while syringic acid was oxidized to 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone. Additionally, dimerization of sinapic acid, caffeic acid and ferulic acid by CotA was observed and highest activity of CotA was found towards sinapic acid.

3.2.2. Introduction

Laccases (benzenediol:oxygen oxidoreductases; EC 1.10.3.2.) belong to a diverse group of multicopper “blue” oxidases. This family comprises beside laccase, ascorbate oxidase (EC 1.10.3.3), ceruloplasmin (EC 1.16.3.1.) and various manganese oxidases. Laccases couple the four electron reduction of molecular oxygen to water with the oxidation of a broad range of substrates including phenols, arylamines, anilines and thiols (Thurston 1994). Their catalytic center contains four catalytic copper atoms, conventionally classified into three types according to the copper’s coordination and spectroscopic properties (Messerschmidt and Huber 1990). Type 1 (T1) copper (“blue copper”) is a mononuclear center involved in substrate oxidation, while the T2 copper and the binuclear T3 copper form a trinuclear cluster, the oxygen binding and reduction site.

Laccases are widely distributed among fungi, higher plants (Reinhammar and Malstrom 1981) and also bacteria (Claus 2003). In fungi they are involved in degradation of lignin (Bourbonnais and Paice 1990), pigment production (Clutterbuck 1972) and plant pathogenesis (Geiger et al. 1986). In plants they participate in the lignification process (Omalley et al. 1993). Due to the broad substrate spectrum of laccases and their wide spectrum of catalyzed reactions, which include cross-linking of monomers, degradation of polymers, ring cleavage and oxyfunctionalization of aromatic compounds, they are considered to be industrially relevant enzymes. Biotechnological applications of laccases include bleaching in the pulp and paper industry, textile dye bleaching, construction of biosensors for detections of phenolic pollutants, biotransformations and bioremediation (Mayer and Staples 2002). Another potential field of application of laccases lies in the synthesis of natural products like pigments and antioxidants through dimerization of phenolic and non-phenolic acids (Mustafa et al. 2005).

Currently only fungal laccases are used in biotechnological processes (Xu et al. 2007). Moreover, most of the characterized enzymes have been isolated from fungi (Mayer and Staples 2002). However, efficient recombinant expression of fungal laccases, often required for the biotechnological applications, is much more difficult than expression of bacterial enzymes. Unavailable sequence information, exon-intron structure of eukaryotic laccase genes, formation of disulfide bridges and glycosylation of laccases are frequently obstructive. To date, only few bacterial laccases have been studied, although rapid progress in genome analysis suggests that these enzymes are also widespread in bacteria (Claus 2003). Physiological functions of these enzymes have been investigated and include roles in melanin

production, spore coat resistance, involvement in morphogenesis and detoxification of copper (Sharma et al. 2007). The most well-known representative is CotA from *Bacillus subtilis*, an endospore coat protein with high thermostability (Hullo et al. 2001). Other laccases have been found in *E. coli* (CueO) (Roberts et al. 2002), *Bacillus halodurans* (Lbh-1) (Ruijssenaars and Hartmans 2004), *Thermus thermophilus* (TTC1370) (Miyazaki 2005) and in several streptomycetes (Arias et al. 2003, Endo et al. 2003). Although biochemical properties of these enzymes have been extensively studied, only little effort has been made to investigate their substrate specificity and dimerization activity.

To obtain a novel biocatalyst of potential biotechnological relevance, we searched nucleotide and protein databases for putative bacterial laccases. A protein from *Bacillus licheniformis*, annotated as “multicopper oxidase” was identified. The corresponding gene was cloned, expressed and characterized with respect to its biochemical and catalytical properties, focussing mainly on dimerization of phenolic and non-phenolic acids.

3.2.3. Material and methods

3.2.3.1. Materials

All chemical reagents were of analytical grade or higher and purchased from Fluka (Buchs, Switzerland) or Sigma (Deisenhofen, Germany). Enzymes were obtained from Fermentas (St. Leon-Rot, Germany) or New England Biolabs (Massachusetts, USA).

3.2.3.2. Strains and culture conditions

B. licheniformis DSM 13 was obtained from DSMZ (German collection of microorganisms). *E. coli* strain DH5 α (F⁻ Φ 80*dlacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17 supE44 thi-1 gyrA96 relA1*) was purchased from Clontech (Saint-Germain-en-Laye, France), *E. coli* strain BL21(DE3) (B F⁻ *dcm ompT hsdS*(r_B⁻ m_B⁻) *gal* λ (DE3)) and the pET22b+ vector were purchased from Novagen (Madison, USA). *B. licheniformis* was cultivated overnight in Luria-Bertani (LB) medium at 30°C and 180 rpm.

3.2.3.3. Cloning of the *cotA* gene

Genomic DNA from *B. licheniformis* was isolated by phenol/chloroform extraction and subsequent isopropanol precipitation. Amplification of the gene was performed by PCR with

the primers 5'-CGGTGCATATGAAACTTGAAAAATTCGTTGACCGGC-3' (forward) and 5'-CGTCGAATTCTTATTGATGACGAACATCTGTCACTTC-3' (reverse). Recognition sites for *NdeI* and *EcoRI* endonucleases are indicated in italics. The PCR fragment was digested with *NdeI* and *EcoRI* and then ligated between corresponding sites of the linearized pET22b+ vector, which carries the strong bacteriophage T7 promoter and terminator. The results of cloning were confirmed by sequence analysis.

3.2.3.4. Expression and purification of CotA

E. coli BL21(DE3) cells carrying pET22cotA were grown in 5 ml LB medium supplemented with ampicillin (100 µg ml⁻¹) at 37°C and 180 rpm for 5 h. Afterwards, 500-ml shake flasks containing 50 ml LB or Terrific-Broth (TB) medium supplemented with ampicillin were inoculated with 0.5 ml of the prepared culture and incubated at 37°C and 180 rpm. At an optical density (OD₅₇₈) of 1.6 expression was induced by addition of isopropyl beta-D-thiogalactoside (IPTG) at final concentration of 0.25 mM and 0.1-5.0 mM CuSO₄ was added to the medium. Cells were incubated at different temperatures (16°C, 18°C, 20°C, 25°C and 30°C) in a shaking incubator (140 rpm) overnight. Cells were harvested by centrifugation (3,220×g, 30 min, 4°C) and resuspended in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5, containing 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 0.3 mM CuSO₄. Cell disruption was performed by sonification on ice and the cell debris was removed by centrifugation (8,000×g, 30 min, 4°C). Afterwards, the supernatant was incubated for 15 min at 70°C and denatured proteins were removed by centrifugation (10,000×g, 10 min, 4°C). Purification was performed on an Äkta explorer FPLC-system (Amersham Biosciences, UK). 5 ml of diluted protein solution were loaded on a 22 ml Q-Sepharose FF (Amersham Biosciences) column. The column was washed with three column volumes of 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5. Laccase was eluted from the column with 250 mM sodium chloride in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5. Fractions containing laccase activity (as measured using the ABTS assay) were pooled and concentrated by Amicon ultrafiltration (membrane cut-off 30 kDa, Millipore, USA). Further 0.5 ml of concentrated sample was applied on a 1 ml Resource Q (Amersham Biosciences) column. The column was washed with three column volumes of 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5. Proteins were eluted from the column with 200 mM sodium chloride in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5. Fractions containing laccase activity were pooled and concentrated by ultrafiltration (see above). Sodium chloride was removed by dialysis against 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5 overnight. Protein concentration was determined using

Bradford assay (Bradford 1976). Bovine serum albumin was used as a standard. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was done in a Minigel-Twin (Biometra, Goettingen, Germany) using a 10% polyacrylamide running gel (Laemmli 1970). The isoelectric point was determined using IEF gel, pH 3-10 (Biorad, USA) and broad pI standards following the manufacture's instructions.

3.2.3.5. Spectroscopic analysis

The UV-visible absorption spectrum of pure laccase was recorded in the range of 300-800 nm in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5 on an Ultrospec 3000 UV/vis-spectrometer (Amersham Biosciences). X-band (9.46 GHz) electron paramagnetic resonance (EPR) spectra were recorded with a Bruker EMX spectrometer and an Oxford ESR-900 continuous-flow cryostat. The experimental data recorded at 15 K were compared with different simulations performed with Matlab easyspin. The best fit was obtained by overlapping three simulated Cu(II) spectra for different copper coordinations, two axially symmetric copper species and an isotropic copper signal which can be attributed to free copper atoms in the solution.

3.2.3.6. Laccase activity assays

Laccase activity was routinely assayed at room temperature using ABTS, SGZ or 2,6-DMP as follows. a) The assay mixture contained 0.5 mM ABTS and 0.1 M citrate/phosphate buffer, pH 4.0. Oxidation of ABTS was followed by absorbance increase at 420 nm ($\epsilon_{420} = 36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). b) The assay mixture contained 0.05 mM SGZ (dissolved in DMSO) and 0.1 M citrate/phosphate buffer, pH 7.0. Oxidation of SGZ was followed by absorbance increase at 525 nm ($\epsilon_{525} = 65 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). c) The assay mixture contained 0.5 mM 2,6-DMP and 0.1 M citrate/phosphate buffer, pH 7.0. Oxidation of 2,6-DMP was followed by absorbance increase at 468 nm ($\epsilon_{468} = 49.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). One unit is defined as the amount of enzyme that oxidizes 1 μmol of substrate per min. All assays were performed in triplicate.

3.2.3.7. Characterization of CotA

The effect of pH on the activity of CotA towards ABTS, SGZ and 2,6-DMP was determined in 0.1 M citrate/phosphate buffer, pH 2.6-8.0. Determination of laccase activity at elevated temperatures was performed by measuring ABTS oxidation at temperatures ranging from 25°C to 92.5°C. Enzyme thermostability was measured at 70°C and 80°C by incubating the

enzyme solution (0.6 μM) in 0.1 M citrate/phosphate buffer, pH 4.0. At appropriate times, samples were withdrawn, cooled and residual activity was determined using the ABTS assay. Kinetic parameters of the purified enzyme were determined at room temperature using different concentrations of ABTS (5-500 μM), SGZ (1.25-50 μM) or 2,6-DMP (5-1,000 μM) respectively. The data were fitted to the Michaelis-Menten equation by linear regression.

3.2.3.8. Oxidation of phenolic and non-phenolic acids

All experiments were performed in 20 ml reaction volume in 50-ml round flasks containing 0.05 U ml^{-1} of laccase (determined using the ABTS assay) in 0.1 M citrate/phosphate buffer, pH 5.0. Sinapic acid, ferulic acid, caffeic acid, coumaric acid, cinnamic acid, syringic acid and vanillic acid respectively, were dissolved in 200 μl DMSO and added to the reaction to a final concentration of 5 mM. Reactions were performed under agitation for 2 h. Reaction progress was followed by taking samples in course of reactions. Samples were acidified to pH 2-3 with 6 M HCl, extracted with ethyl acetate, evaporated, redissolved in acetonitrile and analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) measurements. Control reactions were performed in the same manner but without laccase.

3.2.3.9. HPLC and LC-MS analysis

Educts and products of the oxidation reactions were analyzed by HPLC (SIL-10HTA with a DAD detector, Shimadzu, Kyoto, Japan) using a Chromolith Performance RP-18e column (100 \times 4.6 mm). Compounds were monitored by UV absorption (absorption spectra were recorded in the range of 190-800 nm). For analysis, a gradient of solvents A/B (solvent A: acetonitrile; solvent B: 0.01% trifluoroacetic acid) was used at a flow rate of 1 ml min^{-1} . The steps of the gradient were as follows: for sinapic acid: from 75% to 30% of solvent B in 5 min, for syringic acid: 70% of solvent B for 5 min, from 70% to 30% of solvent B in 5 min, for all other acids: from 75% to 20% of solvent B in 10 min, followed by reconditioning of the column. Identification of compounds was performed by comparison of retention times and UV spectra with standards of the educts and a synthesized dimer of sinapic acid (dehydrodisinapic acid dilactone, kindly provided by Prof. Beifuss, University of Hohenheim, Germany).

Mass spectra were obtained with a LCMS-2010EV mass spectrometer (Shimadzu) coupled with liquid chromatography (see above) using a Chromolith Performance RP-18e column (100 \times 3 mm). All analyses were performed in positive and negative scan mode using an

electrospray ionization (ESI) and atmospheric pressure chemical ionization (APCI) source (DUIS-2010, Shimadzu) with the following settings: detector voltage 1.5 kV, probe voltage 4.5 kV, nebulizing gas flow 1.5 l min⁻¹, curve dissolution line (CDL) temperature 230°C, heat block 480°C, Q-array DC 10 V, Q-array RF 150 V. For analysis, the steps of the gradients were as follows: for syringic acid: 70% of solvent B for 5 min, for all other acids: from 75% to 35% of solvent B in 5 min.

3.2.4. Results

3.2.4.1. Identification of a putative bacterial laccase

The search for putative multicopper oxidases within diverse bacterial genomes revealed a vast number of candidate genes, particularly in bacilli, streptomycetes and pseudomonads. We focused on CotA from *Bacillus licheniformis*. The open reading frame of *cotA* (accession no. YP_077905) encodes a 513 amino acid protein annotated as “spore coat protein (outer)”. Multiple sequence alignment, performed using ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>), showed that CotA from *B. licheniformis* contains four histidine-rich copper-binding domains which are characteristic for laccases. Further, a relatively high sequence identity to CotA from *B. subtilis* (63%) was found. Identities to the bacterial laccase CueO from *E. coli* and to laccase Lcc2 from the fungus *Trametes versicolor* were however quite low (25% and 11% respectively).

3.2.4.2. Gene cloning and expression optimization

The *cotA* gene was amplified from genomic DNA of *B. licheniformis* DSM 13 and inserted into the pET22b+ expression vector under control of the T7-phage promoter. *E. coli* BL21(DE3) cells carrying pET22cotA were grown in LB or TB medium and expression was induced with IPTG at temperatures of 16°C, 18°C, 20°C, 25°C and 30°C. Copper was added at different concentrations (0.1-5.0 mM) to assist proper folding of the protein. Highest volumetric activity of 0.37 U ml⁻¹ as measured with ABTS was reached after an overnight expression at 18°C in TB medium supplemented with 2.0 mM CuSO₄. Copper concentrations >2.0 mM negatively affected growth of *E. coli* cells (data not shown).

3.2.4.3. Purification of CotA

After expression of CotA under the optimized conditions, cells were harvested and lysed by sonification. To simplify subsequent purification steps, supernatant was heated at high temperature (70°C, 15 min). While most of the *E. coli* proteins precipitated, no loss in activity was observed for CotA. The protein was further purified using anion-exchange chromatography (Q-Sepharose and Resource Q). Approximately 10 mg of active purified protein was routinely obtained from 1 l of cell culture. It can be concluded, that just 2% of the total protein demonstrated laccase activity. Judging from the lysate fraction on the SDS-gel (Fig. 1), only a minor part of the expressed CotA was active. The specific activity of purified CotA with ABTS was 16 U mg⁻¹. Activity towards the canonical laccase substrate syringaldazine (SGZ) of 18.7 U mg⁻¹ indicated that CotA is a laccase. SDS-PAGE analysis of the enzyme showed a band with a molecular weight of ~65 kDa (Fig. 1). The origin of the minor protein band at ~50 kDa could not be identified. The isoelectric point (pI) of CotA determined using isoelectric focusing was 7.0.

3.2.4.4. Spectral properties of CotA

The purified protein exhibited a deep blue color common to all copper containing enzymes. The UV-visible absorption spectrum of CotA showed a broad band at 575-600 nm with a peak at 590 nm (corresponding to the T1 or blue copper center) and a slight shoulder at 330 nm (corresponding to the T3 binuclear copper center) (data not shown). The 280/600 nm absorbance ratio of purified enzyme was determined to be 11, which is in the range typical for bacterial laccases (Xu et al. 2007). The EPR spectrum (Fig. 2) showed resonances characteristic of T1 and T2 Cu(II) centers (Solomon et al. 1996). The T1 copper center had $g_{\perp} = 2.011$ and $g_{\parallel} = 2.230$ and a hyperfine coupling constant A_{\parallel} of $80 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$. The T2 copper center presented g values of $g_{\perp} = 2.060$ and $g_{\parallel} = 2.395$ and A_{\parallel} of $207 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$. These spectroscopic properties are common to other laccases, confirming that CotA is a laccase (Solomon et al. 1996). The relative abundance of T1:T2 was about 18% : 82%.

3.2.4.5. Biochemical properties of CotA

The pH optimum of CotA was determined in 0.1 M citrate/phosphate buffer, pH 2.6-8.0. Highest activity for ABTS oxidation was found at pH 4.2, while maximal activity for SGZ

and 2,6-dimethoxyphenol (2,6-DMP) oxidation was detected at pH 7.0. Temperature dependence of enzyme activity was measured between 25°C and 92.5°C with ABTS in 0.1 M citrate/phosphate buffer, pH 4.0. Enzyme catalyzed ABTS oxidation was stimulated at elevated temperatures and highest activity was observed at 85°C. Thermostability of CotA was investigated at 70°C and 80°C. A continuous decrease in activity was observed after incubation at 70°C and 80°C, with a more rapid loss in activity at 80°C. After 1 h incubation of CotA at 70°C and 80°C a residual activity of 43% and 8% respectively, was measured.

Initial reaction rates at various concentrations of ABTS, SGZ and 2,6-DMP were determined at pH 4.0 (for ABTS) or pH 7.0 (for SGZ and 2,6-DMP) at room temperature. The dependence of the rate on the substrate concentration followed Michaelis-Menten kinetics. K_M and k_{cat} values of CotA are summarized in Table 1 and compared to the catalytic constants of CotA from *B. subtilis*. For the determination of k_{cat} values it was taken into account that only 18% of purified CotA contained type I copper. Therefore, only 18% of the determined protein concentration was used for k_{cat} calculation. Similar kinetic constants were observed with ABTS and SGZ as substrates. However, K_M value for 2,6-DMP was approximately ten times higher, while k_{cat} value for 2,6-DMP was three times lower compared with kinetic constants for ABTS and SGZ.

3.2.4.6. Oxidation of phenolic and non-phenolic acids

To investigate the substrate specificity and dimerization activity of CotA several phenolic acids (sinapic acid, ferulic acid, caffeic acid, coumaric acid, syringic acid and vanillic acid) and one non-phenolic acid (cinnamic acid) have been tested (Fig. 3). Reactions were performed in 20 ml-scale with 5 mM substrate (dissolved in 200 μ l DMSO) and 0.05 U ml⁻¹ laccase (determined with the ABTS assay). Fig. 4 shows the substrate conversion over 2 h. Reaction progress was followed by HPLC measurements. Neither coumaric acid, nor vanillic acid and cinnamic acid were oxidized by CotA. Highest conversion was observed with sinapic acid (66%), lowest with ferulic acid (15%). Oxidation activities of syringic acid and caffeic acid were nearly identical (22% conversion), however much lower compared to sinapic acid. Further analysis of the reactions revealed different number and distribution of products, as well as different types of reaction (Table 2). Syringic acid was oxidized to a single product, which was identified as 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone (m/z 168). No dimers or oligomers were found. In contrast, dimerization products were identified in reactions with caffeic acid, ferulic acid and sinapic acid. Conversion of caffeic acid yielded two main products (41% and 38%), which were identified as dimers of caffeic acid (m/z of 358) and one unknown minor

product (21%). Although five different products were detected in reaction of CotA with ferulic acid, only one main product (56%) was obtained, which was identified as a dimer of ferulic acid (m/z of 386). Comparing the dimerization reactions, highest selectivity was obtained with sinapic acid. It was oxidized to one main product, a dimer (79%, m/z of 446), and two unknown minor products. The dimer was identified as dehydrodisinapic acid dilactone (Fig. 5) (Lacki and Duvnjak 1998). No oxidation of the investigated compounds has been observed in reactions without CotA.

3.2.5. Discussion

Laccases offer a great potential for industrial applications and some processes already exist, which are based on fungal laccases (Xu et al. 2007). Although these enzymes are widespread in bacteria as well, only a few of them have been characterized till now. Here, we describe cloning, expression and characterization of a new bacterial laccase from *B. licheniformis*.

The putative laccase gene from *B. licheniformis* (*cotA*) was heterologously expressed in *E. coli*. Expression was enhanced by exogenous copper addition and by decrease of expression temperature. Remarkably, only a minor part of the expressed enzyme was active, probably due to insufficient copper incorporation. Further increase of intracellular copper concentration by higher exogenous copper addition is restricted by the toxic effect of copper. Loading of inactive laccase with copper ions for reconstitution of laccase activity has been reported for CueO from *E. coli* (Li et al. 2007), but was not successful with CotA. Neither incubation with up to 10 mM CuSO₄, nor dialysis over night against 50 mM potassium phosphate buffer pH 7.5 with 0.3 mM CuSO₄ increased activity of CotA towards ABTS.

Recombinant CotA is a monomeric protein with a molecular weight of ~65 kDa. CotA exhibits the typical blue color, characterizing all “blue” copper oxidases, due to its absorbance at 600 nm. The EPR signal is similar to that of other laccases (Solomon et al. 1996), showing the presence of T1 and T2 copper centers. From its spectroscopic properties and the laccase-specific capability to oxidize SGZ, CotA was identified as a laccase.

The pH optimum of CotA for oxidation of ABTS (4.2), SGZ (7.0) and 2,6-DMP (7.0) corresponds to that of other bacterial and also some fungal laccases (Kiiskinen et al. 2002, Martins et al. 2002). Highest activity for ABTS oxidation at very high temperature (85°C) has also been reported for CotA from *B. subtilis* (75°C) (Martins et al. 2002), in contrast to CueO (55°C) (Roberts et al. 2002) and many other laccases from mesophilic fungi (30-50°C) (Xu et al. 1996). However, CotA from *B. licheniformis* is not a thermostable laccase like CotA from *B. subtilis*, but showed reasonably thermostability at 70°C, comparable to CueO (Roberts et

al. 2003). Remarkably, K_M values of CotA towards ABTS and SGZ were much lower than those reported for CotA from *B. subtilis* (Table 1) and other bacterial laccases, while k_{cat} values correspond very well with literature data (Martins et al. 2002, Miyazaki 2005, Roberts et al. 2002). The physiological role of CotA is still unclear. Similar biochemical properties and high sequence identity to CotA from *B. subtilis* indicate, that CotA from *B. licheniformis* is a spore coat protein, probably contributing to melanin synthesis.

Although much is known about the substrate spectrum, oxidation and dimerization reactions of fungal laccases, corresponding investigations of bacterial laccases are very limited. We investigated the dimerization activity of CotA in reactions with different phenolic and one non-phenolic acid. CotA was found to catalyze the dimerization of methoxy-substituted 3-(4-hydroxyphenyl)-2-propenoic acids, a reaction considered as industrially interesting for synthesis of natural products. The highest activity was found towards sinapic acid. The main product of this reaction, dehydrodisinapic acid dilactone, has also been isolated from a C-C coupling reaction of sinapic acid using a polyphenol oxidase from the fungus *T. versicolor* (Lacki and Duvnjak 1998). Significantly lower activity of CotA was obtained towards caffeic acid and ferulic acid. Unlike these two compounds, sinapic acid possesses methoxy groups in both ortho-positions of the phenol. These may influence binding or stabilization of the substrate in CotA, thus resulting in higher activity and even selectivity of the laccase towards sinapic acid, compared to caffeic acid and ferulic acid. Coumaric acid without any substituting group in the ortho-position was not oxidized by CotA, although oxidation with a fungal laccase from *Pyricularia oryzae* has already been described (Takahama 1995). Non-phenolic cinnamic acid was not converted by CotA as well. Conversion of the *o*-diphenol caffeic acid yielded two main products, while with ferulic acid, where the *o*-hydroxy group is substituted by a methoxy group, one main product was obtained. Dimerization of caffeic acid can also occur through coupling between the propenoic acid group and the 3,4-dihydroxyphenyl group (Fig. 6) (Pati et al. 2006).

The length of the aliphatic chain of the investigated acids has a stronger effect on activity of CotA than the substituting groups in ortho position of the phenol. For example, the activity of CotA towards syringic acid, a benzoic acid derivative, was much lower compared to sinapic acid, which possesses a propenoic acid group. Remarkably, syringic acid was oxidized by CotA exclusively to 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone and no dimerization products were found, although different fungal laccases from *Rhizoctonia praticola* and *T. versicolor* has been reported to catalyze dimerization of syringic acid (Leonowicz et al. 1984). Furthermore, oxidation and dimerization of vanillic acid was observed with these fungal laccases as well (Leonowicz et al. 1984), but not with CotA. Vanillic acid seems to be too small for efficient

binding and oxidation by CotA. From our findings it can be concluded that oxidation of the investigated phenolic and non-phenolic acids by CotA is clearly affected by both, substitutions in the ortho-positions and the carbon chain length of the phenolic acids. This can be due to the broad substrate binding site of the enzyme, which allows for better fixation of larger substrates and therefore their dimerization. This suggestion will further be proven using mutagenesis experiments.

In summary, we cloned, expressed and characterized a new laccase from *B. licheniformis*. Since CotA of bacterial origin can easily be expressed in *E. coli*, its activity and selectivity can be improved for potential industrial application by means of directed evolution, which is much more complicate in the case of fungal laccases.

Acknowledgments

The thank Prof. Dr. U. Beifuss (University of Hohenheim, Germany) for providing us with dehydrodisinapic acid dilactone. This work was financially supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 706), the Ministerium für Wissenschaft, Forschung und Kunst des Landes Baden-Württemberg and the Fonds der Chemie (Germany).

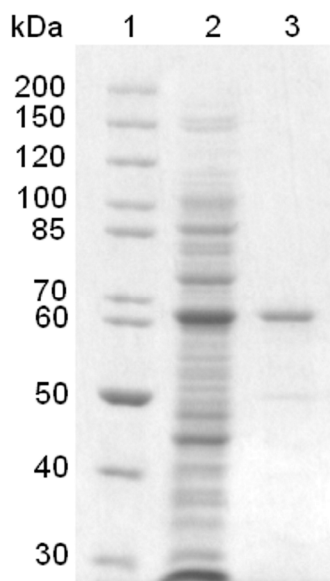


Figure. 1. SDS-PAGE analysis of CotA. Lane 1, molecular size markers (Fermentas); lane 2, induced cell extract, lane 3, purified CotA.

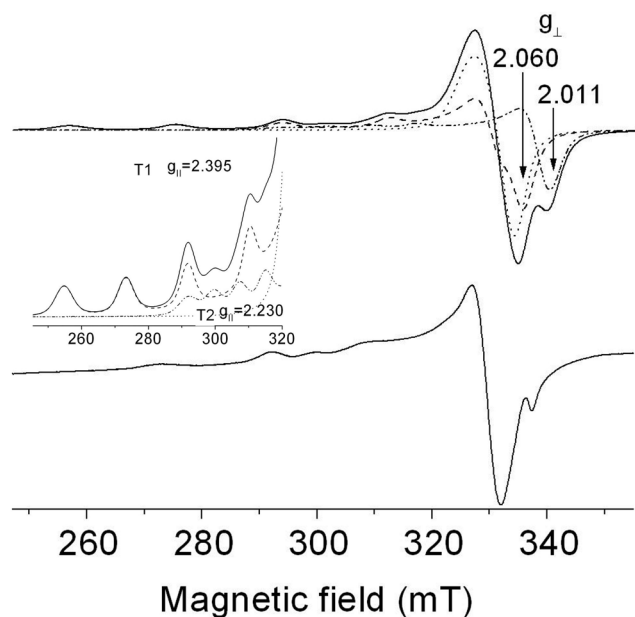


Figure. 2. EPR spectrum of recombinant CotA (3.5 mg ml^{-1}) measured at 15 K (lower curve). The upper spectrum represents a simulation given by a superposition (solid line) of the three components T1 (dotted line, 18%), T2 (dashed line, 82%) and the signal for Cu(II) in solution (dash-dotted line). The inset shows an expanded view of the simulated parallel regime.

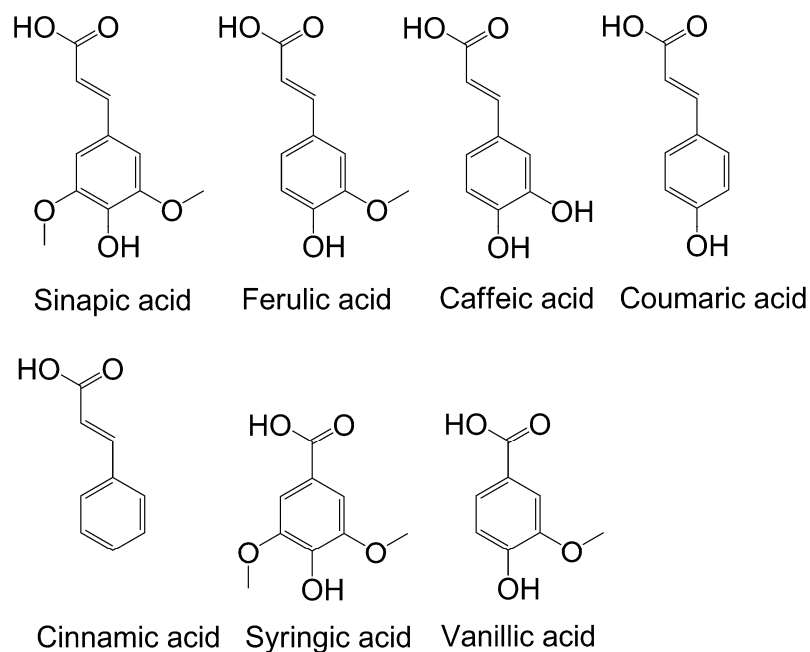


Figure. 3. Structures of the investigated phenolic acids (sinapic acid, ferulic acid, caffeic acid, coumaric acid, syringic acid and vanillic acid) and non-phenolic acid (cinnamic acid).

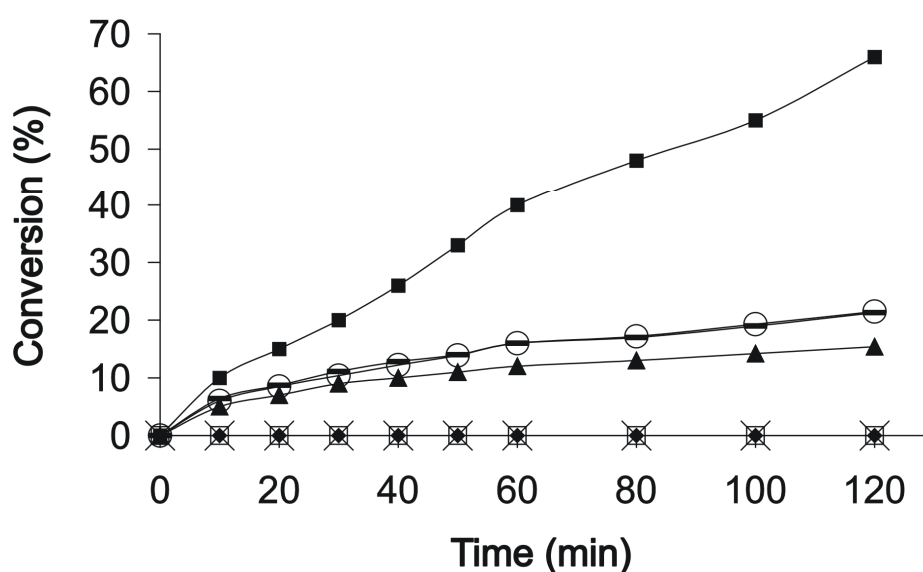


Figure. 4. Progresses of reactions of CotA with sinapic acid, ferulic acid, caffeic acid, coumaric acid, syringic acid, vanillic acid and cinnamic acid. CotA (0.05 U ml⁻¹) was incubated in 0.1 M citrate/phosphate buffer, pH 5.0 with 5 mM of substrate (dissolved in 200 μ l DMSO). Samples were taken in course of reaction and analyzed by HPLC. Closed square, conversion of sinapic acid; dash, of caffeic acid; open circle, of syringic acid; closed triangle, of ferulic acid; cross, of cinnamic acid; closed diamond, of vanillic acid and open square, conversion of coumaric acid.

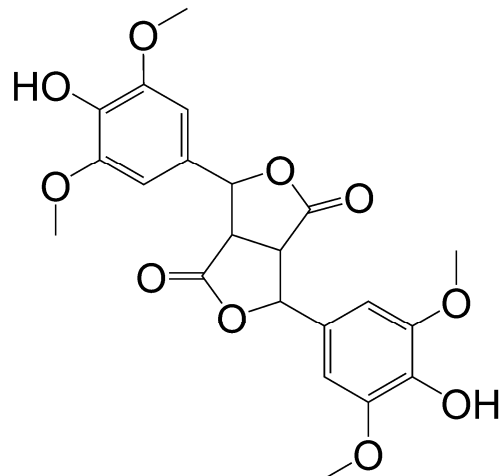


Figure. 5. Structure of dehydrodisinapic acid dilactone (r-1H-2c,6c-bis-(4'-hydroxy-3',5'-dimethoxyphenyl)-3,7-dioxabicyclo-[3,3,0]-octane-4,8-dione), the main product of sinapic acid conversion by CotA.

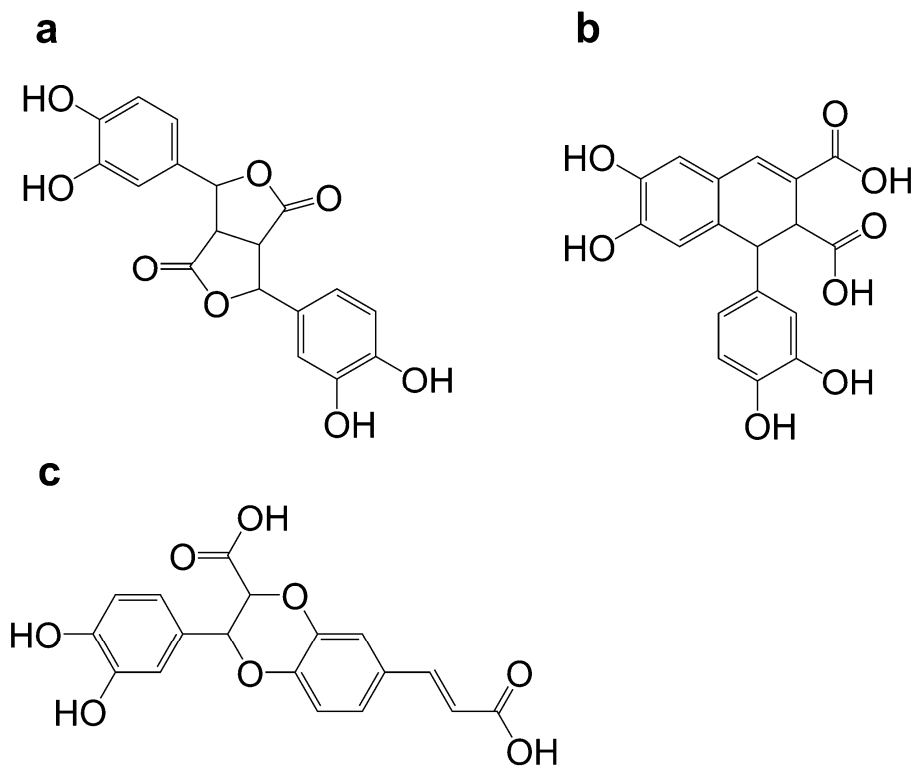


Figure. 6. Proposed structures of caffeic acid dimers. a) C-C/C-O coupled caffeic acid dimer. b) C-C coupled caffeic acid dimer. c) C-O coupled caffeic acid dimer.

Table 1. Kinetic properties of recombinant CotA from *B. licheniformis* compared to that of CotA from *B. subtilis* (Durao et al. 2008).

Substrate	K_M [μM]	k_{cat} [s^{-1}]	K_M [μM]	k_{cat} [s^{-1}]
	CotA _{<i>B. lich.</i>}	CotA _{<i>B. lich.</i>}	CotA _{<i>B. sub.</i>}	CotA _{<i>B. sub.</i>}
ABTS	6.5 ± 0.2	83	124	322
SGZ	4.3 ± 0.2	100	18	80
2,6-DMP	56.7 ± 1.0	28	216	29

Table 2. Reaction analysis of CotA with sinapic, ferulic, caffeic and syringic acid.

Substrate	Number of products	Product distribution (%) ^a					(m/z) of main products	Reaction type
Sinapic acid	3	79	13	8			446	Dimerization
Ferulic acid	5	56	19	13	6	6	386	Dimerization
Caffeic acid	3	41	38	21			358	Dimerization
Syringic acid	1	100					168	Oxidation

^a product distribution was calculated based on the detected peak areas of the HPLC chromatograms

3.2.6. References

- Arias, M. E., M. Arenas, J. Rodriguez, J. Soliveri, A. S. Ball, and M. Hernandez. 2003. Kraft pulp biobleaching and mediated oxidation of a nonphenolic substrate by laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 1953-1958.
- Bourbonnais, R., and M. G. Paice. 1990. Oxidation of nonphenolic substrates - an expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Letters* 267: 99-102.
- Bradford, M. M. 1976. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Claus, H. 2003. Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Archives of Microbiology* 179: 145-150.
- Clutterbuck, A. J. 1972. Absence of laccase from yellow-spored mutants of *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology* 70: 423-435.
- Endo, K., Y. Hayashi, T. Hibi, K. Hosono, T. Beppu, and K. Ueda. 2003. Enzymological characterization of EpoA, a laccase-like phenol oxidase produced by *Streptomyces griseus*. *Journal of Biochemistry* 133: 671-677.
- Geiger, J. P., M. Nicole, D. Nandris, and B. Rio. 1986. Root-rot diseases of *Hevea brasiliensis*.1. Physiological and biochemical aspects of host aggression. *European Journal of Forest Pathology* 16: 22-37.
- Hullo, M. F., I. Moszer, A. Danchin, and I. Martin-Verstraete. 2001. CotA of *Bacillus subtilis* is a copper-dependent laccase. *Journal of Bacteriology* 183: 5426-5430.
- Kiiskinen, L. L., L. Viikari, and K. Kruus. 2002. Purification and characterisation of a novel laccase from the ascomycete *Melanocarpus albomyces*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59: 198-204.
- Lacki, K., and Z. Duvnjak. 1998. Transformation of 3,5-dimethoxy,4-hydroxy cinnamic acid by polyphenol oxidase from the fungus *Trametes versicolor*: Product elucidation studies. *Biotechnology and Bioengineering* 57: 694-703.

- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5.
- Leonowicz, A., R. U. Edgehill, and J. M. Bollag. 1984. The effect of pH on the transformation of syringic and vanillic acids by the laccases of *Rhizoctonia praticola* and *Trametes versicolor*. *Archives of Microbiology* 137: 89-96.
- Li, X., Z. Y. Wei, M. Zhang, X. H. Peng, G. Z. Yu, M. K. Teng, and W. M. Gong. 2007. Crystal structures of *E. coli* laccase CueO at different copper concentrations. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 354: 21-26.
- Martins, L. O., C. M. Soares, M. M. Pereira, M. Teixeira, T. Costa, G. H. Jones, and A. O. Henriques. 2002. Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat. *Journal of Biological Chemistry* 277: 18849-18859.
- Mayer, A. M., and R. C. Staples. 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* 60: 551-565.
- Messerschmidt, A., and R. Huber. 1990. The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin - modeling and structural relationships. *European Journal of Biochemistry* 187: 341-352.
- Miyazaki, K. 2005. A hyperthermophilic laccase from *Thermus thermophilus* HB27. *Extremophiles* 9: 415-425.
- Mustafa, R., L. Muniglia, B. Rovel, and M. Girardin. 2005. Phenolic colorants obtained by enzymatic synthesis using a fungal laccase in a hydro-organic biphasic system. *Food Research International* 38: 995-1000.
- Omalley, D. M., R. Whetten, W. L. Bao, C. L. Chen, and R. R. Sederoff. 1993. The role of laccase in lignification. *Plant Journal* 4: 751-757.
- Pati, S., I. Losito, F. Palmisano, and P. G. Zambonin. 2006. Characterization of caffeic acid enzymatic oxidation by-products by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1102: 184-192.
- Reinhammar, B., and B. G. Malstrom. 1981. Blue copper-containing oxidases, In Lontie L (ed.). *Copper proteins and copper enzymes*. CRC Press Inc., Boca Raton, Fla.: 1-35.

- Roberts, S. A., A. Weichsel, G. Grass, K. Thakali, J. T. Hazzard, G. Tollin, C. Rensing, and W. R. Montfort. 2002. Crystal structure and electron transfer kinetics of CueO, a multicopper oxidase required for copper homeostasis in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 2766-2771.
- Roberts, S. A., G. F. Wildner, G. Grass, A. Weichsel, A. Ambrus, C. Rensing, and W. R. Montfort. 2003. A labile regulatory copper ion lies near the T1 copper site in the multicopper oxidase CueO. *Journal of Biological Chemistry* 278: 31958-31963.
- Ruijsenaars, H. J., and S. Hartmans. 2004. A cloned *Bacillus halodurans* multicopper oxidase exhibiting alkaline laccase activity. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65: 177-182.
- Sharma, R., R. Goel, and N. Capalash. 2007. Bacterial laccases. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23: 823-832.
- Solomon, E. I., U. M. Sundaram, and T. E. Machonkin. 1996. Multicopper oxidases and oxygenases. *Chemical Reviews* 96: 2563-2606.
- Takahama, U. 1995. Oxidation of hydroxycinnamic Acid and hydroxycinnamyl alcohol derivatives by laccase and peroxidase - interactions among p-hydroxyphenyl, guaiacyl and syringyl groups during the oxidation reactions. *Physiologia Plantarum* 93: 61-68.
- Thurston, C. F. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology-UK* 140: 19-26.
- Xu, F., T. Damhus, S. Danielsen, and L. H. Ostergaard. 2007. Catalytic applications of laccase. In Schmid RD, Urlacher VB (eds.). *Modern Biooxidation* Wiley-VCH, Weinheim: 43-75.
- Xu, F., W. S. Shin, S. H. Brown, J. A. Wahleithner, U. M. Sundaram, and E. I. Solomon. 1996. A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability. *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1292: 303-311.

3.3. Improving expression level and catalytic activity of a bacterial laccase by random and site-directed mutagenesis

Katja Koschorreck, Rolf D. Schmid and Vlada B. Urlacher

Institute of Technical Biochemistry, University of Stuttgart, Allmandring 31, 70569 Stuttgart, Germany

3.3.1. Abstract

Background. Laccases offer a huge potential for application in biotechnological processes due to their broad substrate spectrum and wide range of catalyzed reactions, which include formation and degradation of dimers, oligomers and polymers, ring cleavage and oxyfunctionalization of aromatic compounds. A potential field of application of laccases lies in decolorization of textile dyes and synthesis of natural products through dimerization of phenolic acids. Recently, we cloned and characterized the laccase CotA from *Bacillus licheniformis*, which catalyzes dimerization of some phenolic acids. The low expression level of 26 mg l⁻¹ limits, however, its technical application. Here, a combination of random and site-directed mutagenesis was applied to improve expression level and catalytic activity of CotA.

Results. The double mutant K316N/D500G was constructed, which could be produced in *E. coli* at an 11.4-fold higher expression level compared to wild type CotA. Remarkably, this mutant demonstrated significantly higher dimerization activity towards ferulic acid and decolorization activity towards several industrial dyes. Investigation of the effect of both single mutations, K316N and D500G, revealed a major influence of position 316 on enzyme activity and stability and of position 500 on expression level of the laccase.

Conclusions. The constructed laccase double mutant K316N/D500G is an obvious candidate for technical applications due to its high expression level and improved activity towards several phenolic acids and industrial dyes.

3.3.2. Introduction

Laccases (benzenediol:oxygen oxidoreductase; EC 1.10.3.2.) belong to the family of multicopper oxidases along with ascorbate oxidase, ceruloplasmin and various manganese oxidases. Laccases catalyze the four-electron reduction of molecular oxygen to water through the one-electron oxidation of four substrate molecules. They oxidize a broad range of substrates including phenols, arylamines, anilines, thiols and even some inorganic compounds (Thurston 1994, Xu 1996, Xu et al. 1996). Laccases contain four copper ions in three different centers, conventionally classified into three types according to the copper's coordination and spectroscopic properties (Messerschmidt and Huber 1990). The T1 site contains a single Type 1 copper ion, which is tightly coordinated to a cysteine, giving the blue color of laccases. The T2 site is a mononuclear center formed by Type 2 copper, while two strongly coupled Type 3 copper ions are located in the T3 site. Type 2 and Type 3 copper ions form the trinuclear T2/T3 cluster, which serves for oxygen binding and reduction. Substrates are oxidized at the T1 site that mediates the electron transfer to the T2/T3 cluster.

Laccases are widely distributed among fungi, higher plants (Reinhammar and Malstrom 1981), insects (Dittmer et al. 2004, Hoegger et al. 2006) and bacteria (Claus 2003). In fungi they are involved in lignin degradation (Bourbonnais and Paice 1990), pigment production (Clutterbuck 1972) and plant pathogenesis (Geiger et al. 1986). In plants they participate in the lignification process (Omalley et al. 1993). Physiological functions of bacterial laccases are not completely investigated yet. They are suggested to contribute to melanin production, spore coat resistance, morphogenesis and detoxification of copper (Sharma et al. 2007).

Laccases are considered to be industrially relevant enzymes due to their broad substrate spectrum and wide range of catalyzed reactions, which include cross-linking of phenolic compounds, degradation of polymers, ring cleavage and oxyfunctionalization of aromatic compounds. They are especially interesting for biocatalysis, because they do not require the costly cofactors NADH or NADPH as many other oxidoreductases. Biotechnological applications of laccases include bleaching in the pulp and paper industry, textile dye bleaching, detoxification of xenobiotics, organic synthesis and bioremediation (Mayer and Staples 2002). A potential field of application of laccases lies in the synthesis of natural products like pigments and antioxidants through dimerization of phenolic and non-phenolic acids (Mustafa et al. 2005).

Currently only fungal laccases are used in biotechnological processes (Xu et al. 2007). However, efficient recombinant production of fungal laccases, often required for technical

application, is much more difficult than expression of bacterial enzymes. In contrast, expression level, activity and selectivity of bacterial laccases can be improved by means of directed evolution much easier than those of fungal laccases. To date, only few bacterial laccases have been studied, although rapid progress in genome analysis suggests that these enzymes are widespread in bacteria as well (Claus 2003). The most well-known representative is CotA from *Bacillus subtilis*, an endospore coat protein exhibiting high thermostability (Hullo et al. 2001). Other laccases have been described from *Escherichia coli* (CueO) (Roberts et al. 2002), *Bacillus halodurans* (Lbh-1) (Ruijssenaars and Hartmans 2004), *Thermus thermophilus* (TTC1370) (Miyazaki 2005) and several streptomycetes (Arias et al. 2003, Endo et al. 2003, Machczynski et al. 2004, Suzuki et al. 2003). Meanwhile, crystal structures of some bacterial laccases are available and site-directed mutagenesis was used to examine the impact of several conserved amino acid residues on enzyme structure, redox potential and activity (Duraó et al. 2006, Duraó et al. 2008, Li et al. 2007). However, no effort has been made so far to improve activity of bacterial laccases by means of directed evolution, although several reports successfully describe directed evolution of fungal laccases (Alcalde et al. 2006, Bulter et al. 2003a, Festa et al. 2008, Hu et al. 2007, Zumarraga et al. 2007, Zumarraga et al. 2008).

Recently, we cloned and expressed a new laccase from *Bacillus licheniformis*, CotA in *E. coli* (Koschorreck et al. 2008a). CotA was found to catalyze the dimerization of mono- and bisubstituted 3-(4-hydroxyphenyl)-2-propenoic acids like sinapic acid or ferulic acid, a reaction considered as industrially interesting for synthesis of natural products.

In the present work we combined random and site-directed mutagenesis resulting in three CotA mutants with significantly improved expression level. Further mutagenesis of the best mutants yielded one laccase with considerably enhanced dimerization activity towards ferulic acid, as well as with improved decolorization ability.

3.3.3. Methods

3.3.3.1. Materials, strains and plasmids

All chemical reagents were of analytical grade or higher and purchased from Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Germany). Enzymes were obtained from Fermentas (St. Leon-Rot, Germany) or New England Biolabs (Massachusetts, USA). *Escherichia coli* strain NovaBlue(DE3) (F₊ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *deoR* *recA1* *araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str^R) *endA1* *nupG*) was purchased from Invitrogen (Leek,

Netherlands). *E. coli* strain DH5 α (F⁻ Φ 80*dlacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17 supE44 thi-1 gyrA96 relA1*) was obtained from Clontech (Saint-Germain-en-Laye, France), *E. coli* strain BL21(DE3) (B F⁻ *dcm ompT hsdS*(r_B⁻ m_B⁻) *gal* λ (DE3)) and the pET22b+ vector were purchased from Novagen (Madison, USA). GeneMorph II random mutagenesis kit was obtained from Stratagene (La Jolla, CA, USA).

3.3.3.2. Library construction

Random mutations were introduced with low frequency of mutations into the CotA encoding gene from *Bacillus licheniformis* (Koschorreck et al. 2008a) using GeneMorph II random mutagenesis kit. Error-prone PCR was performed with the primers CotA_forward (5'-CTAGTGACATATGAAACTTGAAAAATTCGTTGACCGG-3') and CotA_reverse (5'-CGTCGAATTCTTATTGATGACGAACATCTGTCACCTC-3'). Recognition sites for *NdeI* and *EcoRI* endonucleases are indicated in italics. Cycling parameters were: 95°C (2 min, once), 95°C (1 min), 53°C (1 min), 72°C (2 min), 30 cycles and 72°C (10 min, once). The resulting PCR fragment was digested with *NdeI* and *EcoRI* and ligated in the corresponding sites of the linearized and dephosphorylated pET22b+ vector. *E. coli* NovaBlue (DE3) cells were transformed with the resulting plasmids.

3.3.3.3. Library screening

Single clones were picked into 96-well plates containing 150 μ l Terrific-Broth (TB) medium with 5% dimethyl sulfoxide (DMSO) and 100 μ g ml⁻¹ ampicillin with the help of a picking robot (Biopick automated colony picking system, Biorobotics, Woburn, USA). Plates were incubated at 37°C and 600 rpm (MS1 minishaker, IKA, Staufen, Germany) for 24 h and stored afterwards at -80°C (master plates). New 96-well plates were inoculated from master plates and incubated at 37°C and 600 rpm for 24 h. 96-well deep well plates containing 600 μ l TB medium supplemented with ampicillin were inoculated with the new cultures and incubated for 8 h at 37°C and 600 rpm. Expression was induced by addition of 100 μ l induction solution (TB medium, containing 1.75 mM isopropyl β -D-thiogalactoside (IPTG), 14 mM CuSO₄ and 100 μ g ml⁻¹ ampicillin). Cells were incubated at 25°C and 400 rpm for additional 24 h. Afterwards plates were centrifuged for 20 min at 3,220g, 4°C and pellets were stored at -80°C. For cell lysis, pellets were resuspended in 600 μ l resuspension buffer (50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5 containing 1 mg ml⁻¹ lysozyme, 0.05 U ml⁻¹ DNase and 10 mM MgSO₄) and incubated for 45 min at 37°C. The cell debris was removed

by centrifugation for 30 min at 3,220g, 4°C. Laccase activity assay was performed by transferring 150 µl of lysate to a new 96-well plate with the help of a pipetting robot (Janus Automated Workstation (PerkinElmer). 50 µl of assay solution (0.1 M citrate/phosphate buffer, pH 5.0 containing 5 mM 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) was added to each well. Plates were incubated for 2 min at room temperature and absorption at 420 nm ($\epsilon_{420} = 36,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) was recorded on a microtiter plate spectrophotometer (Spectramax 340 PC, Molecular Devices, Sunnyvale, USA).

3.3.3.4. Site-directed mutagenesis

Mutants K316N, D500N, D500G and K316N/D500G were constructed by PCR using the QuikChangeTM site-directed mutagenesis kit from Stratagene according to the manufacturer's protocol. Mutations were introduced using the following primers:

K316N_forward 5'-GTGACACTGAAAAACCGGATCGGCTGC-3';

K316N_reverse 5'-GCAGCCGATCCGGTTTTTCAGTGTCAC-3';

D500N_forward 5'-CACGAAGATTACAATATGATGCGCCC-3';

D500N_reverse 5'-GGGCGCATCATATTGTAATCTTCGTG-3';

D500G_forward 5'-CACGAAGATTACGGTATGATGCGCCC-3'

and D500G_reverse 5'-GGGCGCATCATAACCGTAATCTTCGTG-3'.

3.3.3.5. Expression and purification of mutants

E. coli BL21(DE3) cells carrying pET22cotA, pET22K316N, pET22D500N, pET22D500G or pET22K316N/D500G were grown in 5 ml Luria-Bertani (LB) medium supplemented with 100 µg ml⁻¹ ampicillin at 37°C and 180 rpm for 5 h. Afterwards, 500-ml shake flasks containing 50 ml Terrific Broth (TB) medium supplemented with ampicillin were inoculated with 0.5 ml of the prepared culture and incubated at 37°C and 180 rpm. At an optical density (OD₅₇₈) of 1.8 expression was induced by addition of 0.25 mM IPTG and 2.0 mM CuSO₄. Cells were incubated at 18°C in a shaking incubator (140 rpm) overnight. The culture was harvested by centrifugation (20 min, 8,000g, 4°C) and pellets were resuspended in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5 containing 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 0.3 mM CuSO₄. Cells were disrupted by sonification on ice and the cell debris was removed by centrifugation (30 min, 8,000g, 4°C). Afterwards, the supernatant was incubated for 15 min at 70°C and denatured proteins were removed by centrifugation (10 min, 10,000g, 4°C). Purification was performed on an Äkta explorer FPLC-system (Amersham

Biosciences, UK). Ten ml of laccase solution were loaded on a 22 ml Q-Sepharose FF (Amersham Biosciences) column. The column was washed with three column volumes of 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5. Laccase was eluted from the column with 250 mM sodium chloride in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5. Fractions containing laccase activity (as measured using the ABTS assay) were pooled, concentrated and desalted by Amicon ultrafiltration (membrane cut-off 10 kDa, Millipore, USA). Protein concentration was determined using Bradford assay (Bradford 1976). Bovine serum albumin was used as a standard.

3.3.3.6. Laccase activity assay

Laccase activity was routinely assayed at room temperature using ABTS. The assay mixture contained 0.5 mM ABTS and 0.1 M citrate/phosphate buffer, pH 4.0. Oxidation of ABTS was followed by absorbance increase at 420 nm ($\epsilon_{420} = 36,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). One unit is defined as the amount of enzyme that oxidizes 1 μmol of substrate per min. The assay was performed in triplicate.

3.3.3.7. Characterization of laccases

Kinetic parameters of purified enzymes were determined at room temperature using the ABTS assay with concentrations of 5-500 μM of ABTS. The data were fitted to the Michaelis-Menten equation by linear regression. Thermal stability of laccases was measured at 70°C by incubating enzyme solutions (0.2 mg ml⁻¹) in 0.1 M citrate/phosphate buffer, pH 4.0, 5.0 and 7.0, respectively. After 30 min, samples were withdrawn, cooled and residual activity was determined using the ABTS assay. Stability at room temperature was determined by incubating 0.8 mg ml⁻¹ laccase solution in 0.1 M citrate/phosphate buffer, pH 4.0, 5.0 and 7.0, respectively. Residual activity was measured after 24 h using the ABTS assay.

3.3.3.8. Oxidation of phenolic and non-phenolic acids

All experiments were performed in 25-ml round flasks containing 50 μg of purified laccase in 10 ml 0.1 M citrate/phosphate buffer, pH 5.0. Sinapic acid, ferulic acid, caffeic acid, coumaric acid, cinnamic acid, syringic acid and vanillic acid, respectively were dissolved in 100 μl DMSO and added to the reaction to a final concentration of 5 mM. Reactions were performed at room temperature for 90 min. Reaction progress was followed by taking samples in course

of reactions. Samples were acidified to pH 2-3 with 6 M HCl, extracted with ethyl acetate, evaporated, redissolved in acetonitrile and analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) measurements. All reactions were performed in triplicate.

3.3.3.9. HPLC and LC/MS analysis

Educts and products of the oxidation reactions were analyzed by HPLC (SIL-10HTA with a DAD detector, Shimadzu, Kyoto, Japan) using a Chromolith Performance RP-18e column (100×4.6 mm). Compounds were monitored by UV absorption (absorption spectra were recorded in the range of 190-800 nm). For analysis, a gradient of solvents A/B (solvent A: acetonitrile; solvent B: 0.01% trifluoroacetic acid) was used at a flow rate of 1 ml min⁻¹. The steps of the gradient were as follows: for sinapic acid: from 75% to 30% of solvent B in 5 min; for syringic acid: from 75% to 65% of solvent B in 5 min, from 65% to 20% of solvent B in 2.5 min; for caffeic acid: from 75% to 55% of solvent B in 10 min, from 55% to 20% of solvent B in 2.5 min; for all other acids: from 75% to 35% of solvent B in 7.5 min followed by reconditioning of the column. Reaction compounds were identified by comparison of retention times and UV spectra with standards of the educts and a synthesized dimer of sinapic acid (dehydrodisinapic acid dilactone, kindly provided by Prof. Beifuss, University of Hohenheim, Stuttgart, Germany).

Mass spectra were obtained with a LCMS-2010EV mass spectrometer (Shimadzu) coupled with liquid chromatography (see above) using a Chromolith Performance RP-18e column (100×3 mm). All analyses were performed in positive and negative scan mode using an electrospray ionization (ESI) and atmospheric pressure chemical ionization (APCI) source (DUIS-2010, Shimadzu). Settings were as follows: detector voltage 1.5 kV, probe voltage 4.5 kV, nebulizing gas flow 1.5 l min⁻¹, curve dissolution line (CDL) temperature 230°C, heat block 480°C, Q-array DC 10 V, Q-array RF 150 V. For analysis, the steps of the gradients were as follows: for syringic acid: 70% of solvent B for 5 min; for all other acids: from 75% to 35% of solvent B in 5 min.

3.3.3.10. Decolorization of dyes

Three dyes, alizarin red S, remazol brilliant blue R (RBBR) and indigo carmine were used to evaluate the ability of CotA and its mutants to decolorize industrial dyes. The enzymatic treatment of dyes was performed in the presence or absence of 1 mM redox mediator (violuric acid) in 1 ml 0.1 M citrate/phosphate buffer, pH 5.0 containing 0.04 mg ml⁻¹ of dye and 10 µg

of purified laccase. Reaction mixtures were incubated at room temperature and decolorization activity of laccases was determined on a spectrophotometer as the relative decrease of absorbance at the absorbance maximum of each dye. The test wavelengths for alizarin red S, RBBR and indigo carmine were 423 nm, 592 nm and 595 nm, respectively. All reactions were performed in triplicate.

3.3.4. Results

3.3.4.1. Construction and characterization of mutants

Random mutations were introduced into the *cotA* gene from *B. licheniformis* through error-prone PCR. Totally 10,000 clones were obtained by transformation of *E. coli* NovaBlue (DE3) cells. Ten individual clones have been sequenced and a mutation frequency of 1-5 mutations per laccase gene was determined. Analysis of 6,000 clones with respect on their activity towards 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) revealed, that despite of a low mutation frequency 38% of clones had no activity at all. Twenty clones with increased ABTS activity compared to wild type CotA were selected and expressed in shake flasks. Eight of these clones demonstrating significantly higher activity towards ABTS compared to wild type CotA were further analyzed by sequencing. Each of these mutants possessed 1-3 amino acid substitutions. Remarkably, two mutations, K316N and D500N, were found independently in several clones among other mutations. Multiple sequence alignment revealed that amino acid at position 500 in CotA is highly conserved among fungal and bacterial laccases (Figure 1). Despite CotA from *B. subtilis* and CotA from *B. licheniformis*, both carrying Asp500, glycine was found at position 500 in all other selected fungal and bacterial laccases (Figure 1). Position 316 is not very conserved among laccases, but Asn316 was found in some fungal and bacterial laccases as well. In order to investigate the effect of each of these mutations on activity and expression level of CotA, three single mutants, K316N, D500N and D500G have been constructed. Volumetric activity measured with ABTS reached 1.1 U ml⁻¹ for K316N and 0.87 U ml⁻¹ for D500N, which is significantly higher compared to wild type CotA (0.41 U ml⁻¹). Replacing Asp500 by the conserved glycine resulted in a 5.4-fold increased volumetric activity (2.2 U ml⁻¹). Additionally, the double mutant K316N/D500G was constructed to study the impact of combined mutations on laccase activity. The volumetric activity of the double mutant was 8.3-fold higher (3.4 U ml⁻¹) compared to wild type CotA.

Catalytic properties of purified CotA mutants were determined with ABTS and compared to those of the wild type enzyme (Table 1). K_M values of the mutants were only slightly higher and specific activities and catalytic efficiencies somewhat lower compared to wild type CotA. According to this, the increase in volumetric activity must derive from increased expression levels of the mutant enzymes. Calculating the protein yield on the basis of volumetric and specific activity results in an 11.4-fold increase in expression level of the double mutant K316N/D500G compared to wild type CotA. Approximately 300 mg of K316N/D500G can be obtained from 1 l of culture.

Since CotA is stable at elevated temperatures, thermal stability of the mutants was studied at 70°C. Generally, thermal stability decreased at lower pH values (Table 2). K316N/D500G was completely inactivated after 30 min incubation at 70°C and pH 4.0, but quite stable at pH 7.0 (81% residual activity). The single mutants K316N, D500G and wild type CotA retained 25%, 28% and 58%, respectively of their initial activities at pH 4.0 and demonstrated high stability at pH 7.0 as well (81% - 82% residual activity). At room temperature lowest stability for all enzymes was observed again at pH 4.0, while stabilities at pH 5.0 and 7.0 were much higher. K316N and K316N/D500G retained 80% and 81%, respectively of their initial activities after 24 h at pH 5.0 and 7.0. Stability of D500G and wild type CotA was, however, significantly higher at these pH values (90% - 93% residual activity).

The calculated pI value of the double mutant K316N/D500G and CotA was 6.81. The pI of K316N was somewhat lower (6.74), while the calculated pI of D500G was only slightly higher (6.89) than of wild type CotA.

3.3.4.2. Oxidation of phenolic and non-phenolic acids

Recently, CotA was shown to catalyze the dimerization of sinapic acid, ferulic acid and caffeic acid and the oxidation of syringic acid to 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone (Koschorreck et al. 2008a). To investigate changes in the substrate specificity and enzyme activity of the constructed mutants several phenolic acids (sinapic acid, ferulic acid, caffeic acid, coumaric acid, syringic acid and vanillic acid) and one non-phenolic acid (cinnamic acid) were tested (Figure 2). Neither coumaric acid, nor vanillic acid and cinnamic acid were oxidized by the mutants, as it was shown for wild type CotA as well (Table 3). While wild type CotA showed higher activity with sinapic acid, a 50% increase in activity towards ferulic acid was measured for K316N/D500G. Oxidation of caffeic acid was only slightly higher with K316N/D500G compared to CotA (11% increase), while activity towards syringic acid was not altered. Activity of K316N towards sinapic acid, ferulic acid, caffeic acid and syringic

acid was lower or comparable to wild type CotA, but obviously higher than activity of D500G.

Further analysis of the reaction mixtures revealed no changes in number and distribution of products, as well as no change in reaction type by the investigated mutants compared to wild type CotA (Koschorreck et al. 2008a). Syringic acid was oxidized to a single product, 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone (m/z 168). Dimerization products were observed in reactions with sinapic acid, ferulic acid and caffeic acid and highest selectivity among these reactions was obtained with sinapic acid. It was oxidized to the dimer dehydrodisinapic acid dilactone (79%, m/z of 446) (Lacki and Duvnjak 1998) and two unknown minor products. Conversion of caffeic acid yielded two dimers (41% and 38%, m/z of 358) and one unknown minor product (21%). Five different products were detected in reactions of laccases with ferulic acid and a dimer was identified as the main product (56%, m/z of 386). No oxidation of the investigated compounds was observed in reactions without laccases.

3.3.4.3. Decolorization of dyes

Further K316N, D500G, K316N/D500G and wild type CotA were tested and compared for their ability to decolorize different industrial dyes (Figure 3). Alizarin red S and remazol brilliant blue R (RBBR), both anthraquinone dyes, and indigo carmine, an indigo dye, were decolorized by the laccases to a different extent (Figure 4). Generally, decolorization was improved in the presence of the redox mediator violuric acid. The double mutant K316N/D500G showed highest activity towards all three dyes compared to wild type CotA and both single mutants. Activity of K316N and K316N/D500G towards alizarin red S within the first 5 min of reaction was significantly higher (36% and 37%, respectively) compared to D500G and wild type CotA (16% and 18% respectively). After 30 and 60 min of reaction activities of laccases were quite similar. The reaction was only slightly improved in the presence of the mediator.

In contrast, RBBR was not decolorized at all when violuric acid was not added. In the presence of violuric acid highest activity towards RBBR was achieved with K316N/D500G (79% decolorization after 60 min). Activity of K316N in this reaction was comparable to wild type CotA (58% and 56% decolorization after 60 min), while activity of D500G was significantly lower (42% decolorization after 60 min).

Decolorization of indigo carmine was strongly improved in the presence of violuric acid as well and reached almost 100% after 1 h of laccase treatment. After 30 min of reaction K316N and K316N/D500G showed significantly higher decolorization of indigo carmine in the

presence of violuric acid (87% and 88%, respectively) than wild type CotA or D500G (75% and 74%). No decolorization of the investigated dyes was observed in reactions without laccases.

3.3.5. Discussion

Actual random mutagenesis experiments performed on CotA from *B. licheniformis* revealed 38% of completely inactive clones despite of a relatively low mutation frequency of 1-5 mutations per gene. This observation confirmed the literature data, reporting that only few positions in laccases can be mutated without losing activity due to wide highly conserved and functionally essential regions (Festa et al. 2008). Two mutations, K316N and D500N were found in several clones with improved volumetric activity towards ABTS. In order to rationalize the effect of these two positions, homology modeling was performed. Homology models of wild type CotA and K316N/D500G were built on the basis of the crystal structure of CotA from *B. subtilis* (Enguita et al. 2003), which possesses 63% sequence identity to wild type CotA from *B. licheniformis* (Figure 5A). The amino acid residue at position 500 is located in a loop region closed to the T1 site and adjacent to methionine 501, the axial ligand of the T1 copper ion (Figure 5B). As it has been reported previously, replacement of the axial ligand by leucine or phenylalanine in CotA of *B. subtilis* increases the redox potential of the corresponding mutants but severely compromises the catalytic constants (Melo et al. 2007). As mentioned above, the amino acid at position 500 is highly conserved among fungal and bacterial laccases and represented usually by glycine. In our study, replacing aspartic acid at position 500 in CotA by glycine creates a larger space between Gly500 and Met502 (Figure 5B). This might lead to structural changes at the T1 site, resulting in more efficient copper binding and thus in higher expression level, as observed for mutants D500G and K316N/D500G. A structural change at the T1 site might also explain the reduced catalytic activity of D500G.

Position 316 is located at the end of a β -strand on the surface of the protein, far from position 500 and the copper centers, however, pointing to the interior (Figure 5A). This position is represented by asparagine in some bacterial and fungal laccases, inclusively CotA from *B. subtilis*, however, proline, aspartic acid, glutamine, leucine, alanine and threonine residues were found in other laccases as well. Analysis of the stability of the constructed mutants revealed that stability of K316N/D500G was mainly affected by the mutation K316N. Although this position seems to have an effect mainly on catalytic activity of the enzyme, in combination with D500G, it resulted in a significant improvement of the expression level as

well. Up to 300 mg of K316N/D500G can be obtained from 1 l of culture in shake flasks. This is much higher than yields of fungal laccases reached in *Pichia* (Colao et al. 2006, Hong et al. 2006, O'Callaghan et al. 2002) and in the range of highly expressed *Melanocarpus albomyces* laccase in *Trichoderma reesei* in shake flasks (Kiiskinen et al. 2004).

Remarkably, the combination of K316N and D500G resulted even in a much more active enzyme with, for example, 50% higher specific activity towards ferulic acid and 11% higher specific activity towards caffeic acid compared to wild type CotA. Unlike ferulic acid and caffeic acid, sinapic acid possesses methoxy groups in both *ortho*-positions of the phenol. Mutations K316N and D500G probably lead to changes in the substrate binding site, thus enabling better binding or stabilization of monosubstituted phenolic acids, like ferulic and caffeic acid, than the bisubstituted sinapic acid. This is also reflected by the lower oxidation of the bisubstituted syringic acid by K316N and D500G, both showing significantly lower activity towards sinapic acid than wild type CotA. Furthermore, the double mutant K316N/D500G demonstrated significantly improved specific activity towards the tested dyes when compared to any single mutant or wild type CotA. Since decolorization activity of K316N was higher than both D500G and wild type CotA, it is obvious that mutation K316N mainly contributes to increased catalytic activity of K316N/D500G. Generally, it was shown that the addition of a redox mediator significantly improved decolorization of dyes, as described in the literature (Soares et al. 2001, Wong and Yu 1999). Again here, the best activity towards all substrates was observed with K316N/D500G, which is therefore an obvious candidate for technical applications.

3.3.6. Conclusions

In summary, by using a combination of random and site-directed mutagenesis we constructed the double mutant K316N/D500G of the laccase CotA from *B. licheniformis*. K316N/D500G showed an 11.4-fold higher expression level, improved activity in dimerization of phenolic acids and decolorization of several dyes compared to wild type CotA. Characterization of the corresponding single mutants revealed that glycine at position 500 contributes obviously to high expression level of the laccase in *E. coli*. However, it simultaneously reduces specific activity of the enzyme. Contrary, asparagine at position 316 was shown to improve expression level and specific activity of the laccase, but reduces stability. Interestingly, the synergetic effect of both mutations on enzyme properties could not be predicted based on their separate impacts. Laccases are very attractive enzymes for green chemistry, because they work with molecular oxygen, produce water as a by-product and do not require the costly cofactors

NADH or NADPH as many other oxidoreductases. The high expression level and improved activity of K316N/D500G offers for the first time the opportunity to use a bacterial laccase for biotechnological applications.

Acknowledgments

This work was financially supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 706), the Ministerium für Wissenschaft, Forschung und Kunst des Landes Baden-Württemberg and the Fonds der Chemie (Germany).

<i>T. versicolor</i>	IRFQTDNLGPWF LHCHIDFHLEAGFAIVFAEDVADVKAANP
<i>T. villosa</i>	IRFTTDNPGPWF LHCHIDFHLEAGFAIVWGEDTADTASANP
<i>T. hirsuta</i>	IRFDTNPNPGPWF LHCHIDFHLEGGFAVVMAEDT PDVKAVNP
<i>T. pubescens</i>	IRFRTDNPGPWF LHCHIDFHLEAGFAVVFAEDI PDVASANP
<i>P. cinnabarinus</i>	IRFETNPNPGPWF LHCHIDFHLDAGFAVVMAEDT PDTKAANP
<i>P. ostreatus</i>	IRFVTDNPGPWF LHCHIDWHLEIGLAVVFAEDVT SI TAP--
<i>C. cinerea</i>	IRFVTDNPGPWF FHCHIEFHLMNGLAIVFAEDMANTVDANN
<i>M. albomyces</i>	LAFRTDNPGAWLFHCHIAWHVSGGLSVDF LERPADLRQRIS
<i>A. bisporus</i>	FRFFTDNPGAWF LHCHIDWHLEAGLAIVFAEAPEDNVSGPQ
<i>N. crassa</i>	IAFRTDNPGSWLMHCHIAWHVSGGLSNQF LERAQDLRNSIS
<i>E. coli</i>	FNHDAPKEHAYMAHCHLLEHEDTGMMLGF TV-----
<i>T. thermophilus</i>	LLVPLREKGRTVFHCHIVEHEDRGMGMVLEVG-----
<i>S. lavendulae</i>	MGRFDGAYGRFMYHCHLLEHEDMGMMPFVVMPEAMKF--
<i>B. halodurans</i>	IVFEAKNPGNWMFHCHEFHASGGMVAEIHYEYGFEL-----
<i>B. subtilis</i>	AATFGPYSGRYVWHCHI LEHEDYDMMRPMDITDP-----
<i>B. licheniformis</i>	IATFAPYSGRYVWHCHI LEHEDYDMMRPLEVTDVDR-----

Figure 1. C-terminal sequence alignment of several fungal and bacterial laccase genes. Highly conserved regions are represented against a grey background. The conserved glycine, corresponding to position 500 in laccase CotA from *B. licheniformis* is framed.

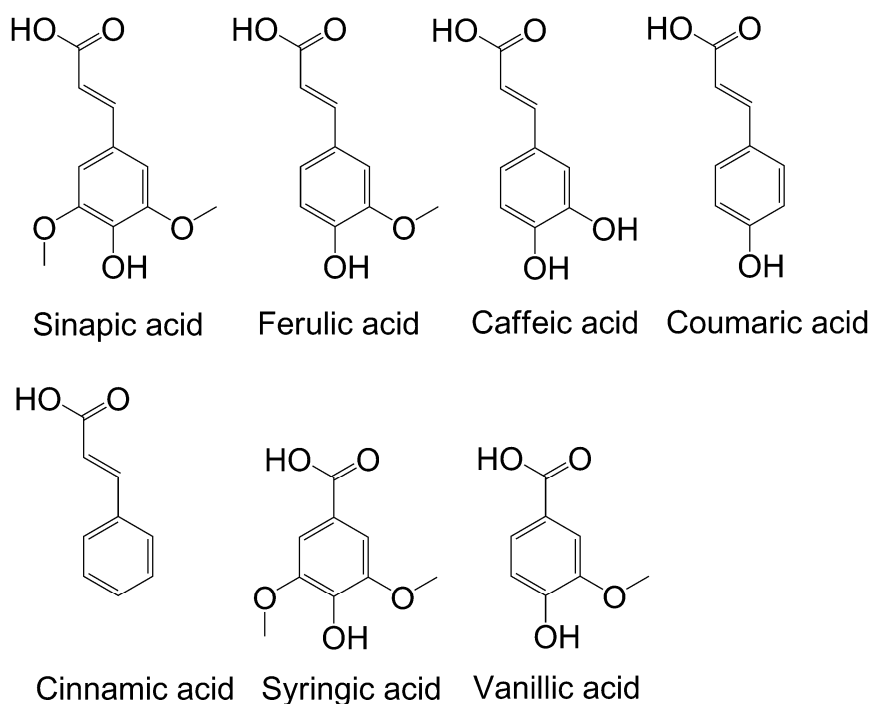


Figure 2. Structures of the investigated phenolic and non-phenolic acids.

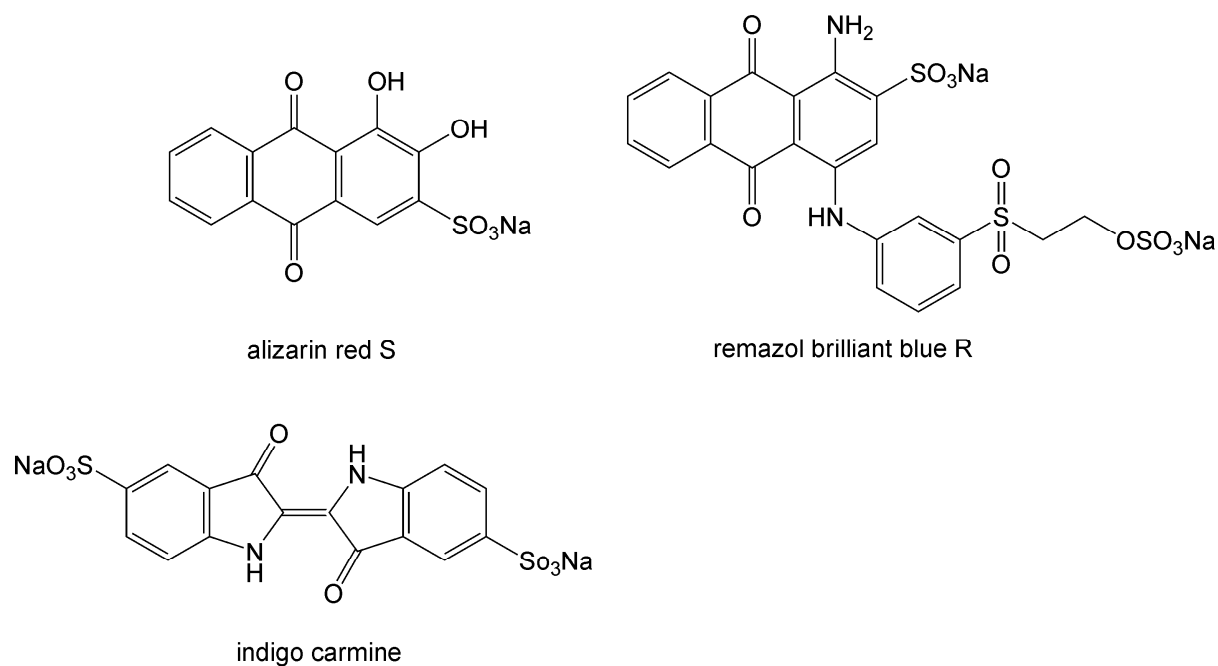


Figure 3. Structures of the investigated dyes.

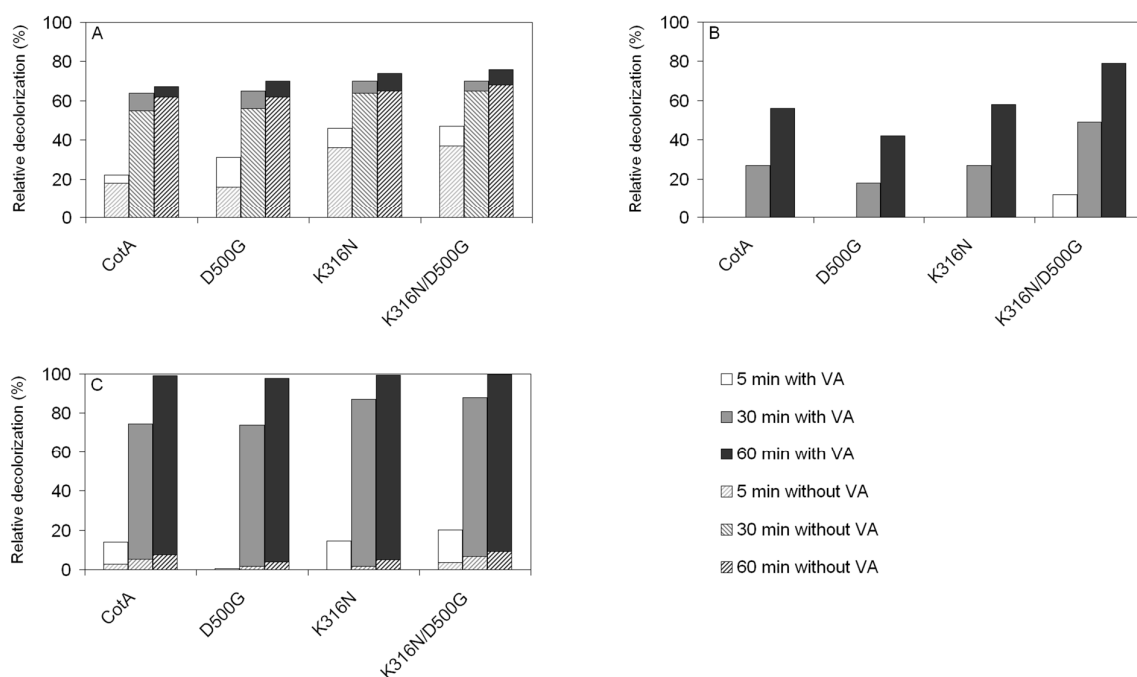


Figure 4. Decolorization of different industrial dyes. Decolorization catalyzed by wild type CotA and constructed mutants was investigated in the absence and presence of the redox mediator violuric acid (VA) after 5, 30 and 60 min of reaction. A) Decolorization of alizarin red S; B) decolorization of remazol brilliant blue R; C) decolorization of indigo carmine.

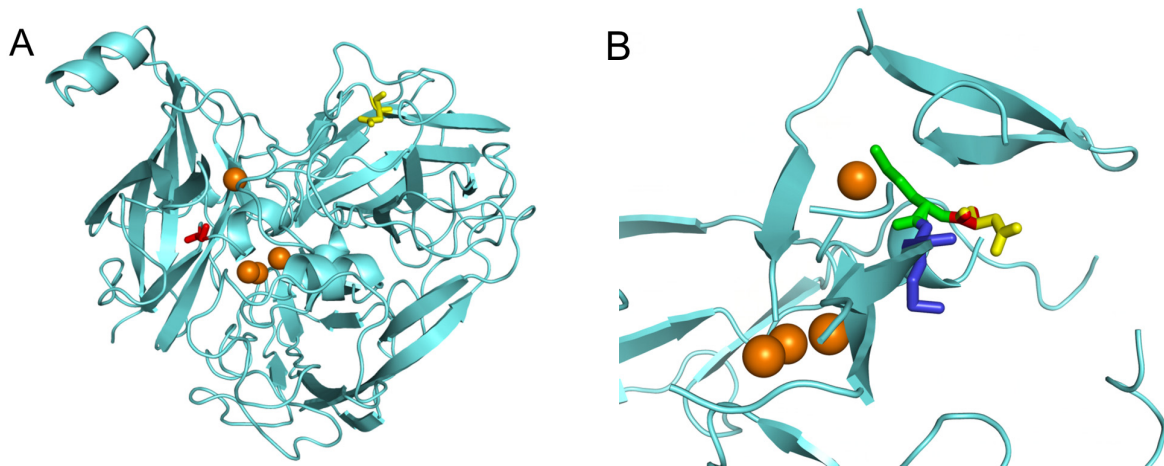


Figure 5. Ribbon presentation of the homology model of K316N/D500G. A) Amino acid residue asparagine 316 is shown in yellow, glycine 500 is shown in red. The T1 copper and the trinuclear copper cluster are highlighted in orange. B) Superposition of the catalytic center of wild type CotA and K316N/D500G with Asp500 shown in yellow, Gly500 shown in red, the axial T1 ligand Met501 shown in green and Met502 shown in blue. The T1 copper and the trinuclear copper cluster are highlighted in orange.

Table 1. Catalytic parameters and expression levels of wild type CotA and constructed mutants.

Enzyme variant	K_M (μM) ^a	Specific activity ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) ^a	Catalytic efficiency ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$)	Volumetric activity (U l^{-1}) ^a	Protein yield (mg l^{-1}) ^b	Improvement factor
CotA	6.5 ± 0.2	16.0	2.46	410	26	1
D500G	9.5 ± 0.2	11.1	1.17	2200	199	7.8
K316N	10.0 ± 0.3	14.0	1.40	1100	79	3.1
K316N/ D500G	8.4 ± 0.2	11.7	1.39	3400	291	11.4

^a Determined using ABTS as substrate in 0.1 M citrate/phosphate buffer, pH 4.0. Each value was calculated from three different experiments.

^b Calculated on the basis of volumetric activity and specific activity of each laccase variant.

Table 2. Stability of laccases at 70°C and room temperature at different pH values.

Enzyme variant	Residual activity after 30 min at 70°C (%) ^a			Residual activity after 24 h at room temperature (%) ^b		
	pH 4.0	pH 5.0	pH 7.0	pH 4.0	pH 5.0	pH 7.0
CotA	58	80	82	80	90	93
D500G	28	78	82	57	90	91
K316N	25	73	81	50	80	80
K316N/D500G	0	59	81	23	81	81

^a Residual activity was determined after 30 min incubation of enzymes at 70°C in 0.1 M citrate/phosphate buffer, pH 4.0, 5.0 and 7.0 using the ABTS assay. Residual activities were normalized to the initial activities of the laccases at 25°C, taken as 100%. Each value was calculated from three different experiments.

^b Residual activity was determined after 24 h incubation of enzymes at room temperature in 0.1 M citrate/phosphate buffer, pH 4.0, 5.0 and 7.0 using the ABTS assay. Residual activities were normalized to the initial activities of the laccases, taken as 100%. Each value was calculated from three different experiments.

Table 3. Conversion of phenolic and non-phenolic acids by laccases after 90 min of reaction.

Enzyme variant	Conversion after 90 min (%)						
	Sinapic acid	Ferulic acid	Caffeic acid	Coumaric acid	Cinnamic acid	Syringic acid	Vanillic acid
CotA	49	14	18	0	0	18	0
D500G	31	13	10	0	0	7	0
K316N	39	15	14	0	0	12	0
K316N/D500G	45	21	20	0	0	18	0

3.3.7. References

- Alcalde, M., M. Zumarraga, J. Polaina, A. Ballesteros, and F. J. Plou. 2006. Combinatorial saturation mutagenesis by in vivo overlap extension for the engineering of fungal laccases. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 9: 719-727.
- Arias, M. E., M. Arenas, J. Rodriguez, J. Soliveri, A. S. Ball, and M. Hernandez. 2003. Kraft pulp biobleaching and mediated oxidation of a nonphenolic substrate by laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 1953-1958.
- Bourbonnais, R., and M. G. Paice. 1990. Oxidation of nonphenolic substrates - an expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Letters* 267: 99-102.
- Bradford, M. M. 1976. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Bulter, T., M. Alcalde, V. Sieber, P. Meinhold, C. Schlachtbauer, and F. H. Arnold. 2003. Functional expression of a fungal laccase in *Saccharomyces cerevisiae* by directed evolution. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 987-995.
- Claus, H. 2003. Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Archives of Microbiology* 179: 145-150.
- Clutterbuck, A. J. 1972. Absence of laccase from yellow-spored mutants of *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology* 70: 423-435.
- Colao, M. C., S. Lupino, A. M. Garzillo, V. Buonocore, and M. Ruzzi. 2006. Heterologous expression of lcl1 gene from *Trametes trogii* in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. *Microbial Cell Factories* 5: -.
- Dittmer, N. T., R. J. Suderman, H. Jiang, Y. C. Zhu, M. J. Gorman, K. J. Kramer, and M. R. Kanost. 2004. Characterization of cDNAs encoding putative laccase-like multicopper oxidases and developmental expression in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34: 29-41.

- Durao, P., I. Bento, A. T. Fernandes, E. P. Melo, P. F. Lindley, and L. O. Martins. 2006. Perturbations of the T1 copper site in the CotA laccase from *Bacillus subtilis*: structural, biochemical, enzymatic and stability studies. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 11: 514-526.
- Durao, P., Z. Chen, C. S. Silva, C. M. Soares, M. M. Pereira, S. Todorovic, P. Hildebrandt, I. Bento, P. F. Lindley, and L. O. Martins. 2008. Proximal mutations at the type 1 copper site of CotA laccase: spectroscopic, redox, kinetic and structural characterization of I494A and L386A mutants. *Biochemical Journal* 412: 339-346.
- Endo, K., Y. Hayashi, T. Hibi, K. Hosono, T. Beppu, and K. Ueda. 2003. Enzymological characterization of EpoA, a laccase-like phenol oxidase produced by *Streptomyces griseus*. *Journal of Biochemistry* 133: 671-677.
- Enguita, F. J., L. O. Martins, A. O. Henriques, and M. A. Carrondo. 2003. Crystal structure of a bacterial endospore coat component. A laccase with enhanced thermostability properties. *Journal of Biological Chemistry* 278: 19416-19425.
- Festa, G., F. Autore, F. Fraternali, P. Giardina, and G. Sannia. 2008. Development of new laccases by directed evolution: functional and computational analyses. *Proteins* 72: 25-34.
- Geiger, J. P., M. Nicole, D. Nandris, and B. Rio. 1986. Root-rot diseases of *Hevea brasiliensis*.1. Physiological and biochemical aspects of host aggression. *European Journal of Forest Pathology* 16: 22-37.
- Hoegger, P. J., S. Kilaru, T. Y. James, J. R. Thacker, and U. Kues. 2006. Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. *FEBS Journal* 273: 2308-2326.
- Hong, Y., Y. Xiao, H. Zhou, W. Fang, M. Zhang, J. Wang, L. Wu, and Z. Yu. 2006. Expression of a laccase cDNA from *Trametes* sp. AH28-2 in *Pichia pastoris* and mutagenesis of transformants by nitrogen ion implantation. *FEMS Microbiology Letters* 258: 96-101.
- Hu, M. R., Y. P. Chao, G. Q. Zhang, X. Q. Yang, Z. Q. Xue, and S. J. Qian. 2007. Molecular evolution of *Fomes lignosus* laccase by ethyl methane sulfonate-based random mutagenesis in vitro. *Biomolecular Engineering* 24: 619-624.

- Hullo, M. F., I. Moszer, A. Danchin, and I. Martin-Verstraete. 2001. CotA of *Bacillus subtilis* is a copper-dependent laccase. *Journal of Bacteriology* 183: 5426-5430.
- Kiiskinen, L. L., K. Kruus, M. Bailey, E. Ylosmaki, M. Siika-aho, and M. Saloheimo. 2004. Expression of *Melanocarpus albomyces* laccase in *Trichoderma reesei* and characterization of the purified enzyme. *Microbiology* 150: 3065-3074.
- Koschorreck, K., S. M. Richter, A. B. Ene, E. Roduner, R. D. Schmid, and V. B. Urlacher. 2008. Cloning and characterization of a new laccase from *Bacillus licheniformis* catalyzing dimerization of phenolic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology* 79: 217-224.
- Lacki, K., and Z. Duvnjak. 1998. Transformation of 3,5-dimethoxy,4-hydroxy cinnamic acid by polyphenol oxidase from the fungus *Trametes versicolor*: Product elucidation studies. *Biotechnology and Bioengineering* 57: 694-703.
- Li, X., Z. Y. Wei, M. Zhang, X. H. Peng, G. Z. Yu, M. K. Teng, and W. M. Gong. 2007. Crystal structures of *E. coli* laccase CueO at different copper concentrations. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 354: 21-26.
- Machczynski, M. C., E. Vijgenboom, B. Samyn, and G. W. Canters. 2004. Characterization of SLAC: a small laccase from *Streptomyces coelicolor* with unprecedented activity. *Protein Science* 13: 2388-2397.
- Mayer, A. M., and R. C. Staples. 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* 60: 551-565.
- Melo, E. P., A. T. Fernandes, P. Durao, and L. O. Martins. 2007. Insight into stability of CotA laccase from the spore coat of *Bacillus subtilis*. *Biochemical Society Transactions* 35: 1579-1582.
- Messerschmidt, A., and R. Huber. 1990. The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin - modeling and structural relationships. *European Journal of Biochemistry* 187: 341-352.
- Miyazaki, K. 2005. A hyperthermophilic laccase from *Thermus thermophilus* HB27. *Extremophiles* 9: 415-425.
- Mustafa, R., L. Muniglia, B. Rovel, and M. Girardin. 2005. Phenolic colorants obtained by enzymatic synthesis using a fungal laccase in a hydro-organic biphasic system. *Food Research International* 38: 995-1000.

- O'Callaghan, J., M. M. O'Brien, K. McClean, and A. D. W. Dobson. 2002. Optimisation of the expression of a *Trametes versicolor* laccase gene in *Pichia pastoris*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 29: 55-59.
- Omalley, D. M., R. Whetten, W. L. Bao, C. L. Chen, and R. R. Sederoff. 1993. The role of laccase in lignification. *Plant Journal* 4: 751-757.
- Reinhammar, B., and B. G. Malstrom. 1981. Blue copper-containing oxidases, In Lontie L (ed.). *Copper proteins and copper enzymes*. CRC Press Inc., Boca Raton, Fla.: 1-35.
- Roberts, S. A., A. Weichsel, G. Grass, K. Thakali, J. T. Hazzard, G. Tollin, C. Rensing, and W. R. Montfort. 2002. Crystal structure and electron transfer kinetics of CueO, a multicopper oxidase required for copper homeostasis in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 2766-2771.
- Ruijsenaars, H. J., and S. Hartmans. 2004. A cloned *Bacillus halodurans* multicopper oxidase exhibiting alkaline laccase activity. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65: 177-182.
- Sharma, R., R. Goel, and N. Capalash. 2007. Bacterial laccases. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23: 823-832.
- Soares, G. M. B., M. T. P. de Amorim, and M. Costa-Ferreira. 2001. Use of laccase together with redox mediators to decolorize Remazol Brilliant Blue R. *Journal of Biotechnology* 89: 123-129.
- Suzuki, T., K. Endo, M. Ito, H. Tsujibo, K. Miyamoto, and Y. Inamori. 2003. A thermostable laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: purification, characterization, nucleotide sequence, and expression. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 67: 2167-2175.
- Thurston, C. F. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology-UK* 140: 19-26.
- Wong, Y. X., and J. Yu. 1999. Laccase-catalyzed decolorization of synthetic dyes. *Water Research* 33: 3512-3520.
- Xu, F. 1996. Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: Correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. *Biochemistry* 35: 7608 -7614.

- Xu, F., T. Damhus, S. Danielsen, and L. H. Ostergaard. 2007. Catalytic applications of laccase. In Schmid RD, Urlacher VB (eds.). *Modern Biooxidation* Wiley-VCH, Weinheim: 43-75.
- Xu, F., W. S. Shin, S. H. Brown, J. A. Wahleithner, U. M. Sundaram, and E. I. Solomon. 1996. A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability. *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1292: 303-311.
- Zumarraga, M., T. Bulter, S. Shleev, J. Polaina, A. Martinez-Arias, F. J. Plow, A. Ballesteros, and M. Alcalde. 2007. In vitro evolution of a fungal laccase in high concentrations of organic cosolvents. *Chemistry & Biology* 14: 1052-1064.
- Zumarraga, M., S. Camarero, S. Shleev, A. Martinez-Arias, A. Ballesteros, F. J. Plou, and M. Alcalde. 2008. Altering the laccase functionality by in vivo assembly of mutant libraries with different mutational spectra. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* 71: 250-260.

4. Schlussfolgerung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden Laccasen aus verschiedenen Mikroorganismen charakterisiert sowie ihre Expression und Aktivität optimiert. Dabei wurde gezeigt, dass sowohl Laccasen aus Pilzen als auch aus Bakterien in der Biokatalyse einsetzbar sind, wo sie beispielsweise zur Synthese von Naturstoffen durch oxidative Kupplung phenolischer Säuren verwendet werden können.

Es wurden vier Laccase-Isoformen des Weißfäulepilzes *T. versicolor*, Lcc α , Lcc β , Lcc γ und Lcc δ , charakterisiert und durch Optimierung der Expressionsbedingungen in *P. pastoris* mit hohen Ausbeuten von bis zu 3400 U l⁻¹ heterolog exprimiert. Damit wurde die Voraussetzung für den biotechnologischen Einsatz der Laccasen geschaffen. Eine weitere Steigerung der Ausbeute soll in nachfolgenden Arbeiten durch die Verbesserung der Fermentationsbedingungen erreicht werden.

Durch Charakterisierung und Vergleich der einzelnen Laccase-Isoformen konnte Lcc β als stabilste Laccase aus *T. versicolor* mit einer hohen Aktivität gegenüber verschiedenen Substraten identifiziert werden. So wies Lcc β im Vergleich zu den anderen Laccasen aus *T. versicolor* in An- wie in Abwesenheit des Redoxmediators ABTS die höchste Aktivität bei der Oxidation polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe auf. Unter Zugabe von ABTS konnten mit Lcc β nach 72 h 0,1 mM Anthracen, Acenaphthen und Acenaphthylen zu über 80% umgesetzt werden, was die bisher mit einem Laccase-Gemisch aus *T. versicolor* und ABTS erzielten Ergebnisse übersteigt (Johannes et al. 1996, Johannes et al. 1998). Damit konnte gezeigt werden, dass der isolierte Einsatz von Lcc β der bisherigen Verwendung eines Laccase-Gemisches aus *T. versicolor* als Biokatalysator vorgezogen werden sollte.

Weiterhin katalysierte Lcc β regioselektiv die oxidative Phenolkupplung von Sinapinsäure zum Dehydrodisinapinsäuredilakton. Dies zeigt die potenzielle Einsetzbarkeit von Lcc β zur Synthese von Naturstoffen wie Antioxidantien und Phytoöstrogenen durch oxidative Kupplung phenolischer Säuren. Lcc δ zeigte bei der Kupplung von 5 mM Sinapinsäure zwar mit 98% Umsatz nach 20 min eine höhere Aktivität als Lcc β (50% Umsatz nach 20 min), ist aber durch die geringe Stabilität für den Einsatz in der Biokatalyse eher ungeeignet. Die Bestimmung der Aktivität und Selektivität von Lcc β gegenüber weiteren phenolischen Säuren sowie Alkoholen, wird zeigen, zur Synthese welcher Naturstoffe diese Laccase konkret geeignet ist.

Weiterhin wurde versucht durch Identifizierung und Austausch von an der Substratbindung beteiligten Aminosäuren, die Aktivität von Lcc β gegenüber Sinapinsäure zu erhöhen. Es konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuren an Position 164 und 265 an der Bindung oder Stabilisierung von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen in Lcc β beteiligt sind. Die Aktivität von Lcc β gegenüber Sinapinsäure blieb aber von den eingeführten Mutationen nahezu unbeeinflusst. Die Erzeugung und Charakterisierung weiterer Lcc β -Varianten wird zeigen, welche Aminosäuren an Position 164 und 265 zur Bindung und Stabilisierung der untersuchten Substrate in Lcc β beitragen und welche keinen Einfluss haben. Das ermöglicht die Aktivität von Lcc β gegenüber Sinapinsäure oder anderen Substraten zu erhöhen und damit die Attraktivität des Enzyms für biotechnologische Anwendungen zu steigern. Kristallstrukturen der Laccasen mit gebundenem Substrat können ebenfalls dazu beitragen, die Substratbindung gezielt durch rationales Protein-Design zu verbessern.

Eine Steigerung der Aktivität von Lcc β durch gerichtete Evolution, für die keine Kristallstrukturen benötigt werden, ist hingegen sehr schwierig. Bisher wurde *S. cerevisiae* als Expressionswirt zur gerichteten Evolution von Laccasen aus Pilzen eingesetzt (Alcalde et al. 2005, Bulter et al. 2003a, Bulter et al. 2003b). Die erreichte Proteinausbeute von Lcc β in *S. cerevisiae* war jedoch für Aktivitätstests im Hochdurchsatzverfahren zu gering. In *E. coli* konnte Lcc β nicht aktiv exprimiert werden. Die Expression von Lcc β in *P. pastoris* war zwar erfolgreich, allerdings erschwert die geringe Transformationseffizienz von *P. pastoris* die Herstellung großer Mutantenbibliotheken. Somit stellt die Verbesserung der Aktivität von Lcc β eine Herausforderung für zukünftige Forschungsarbeiten dar.

Die Verbesserung der Proteineigenschaften durch gerichtete Evolution ist im Falle von bakteriellen Laccasen deutlich einfacher. Diese Enzyme sind nicht glykosyliert und lassen sich üblicherweise gut in *E. coli* exprimieren. In dieser Arbeit wurde eine neue bakterielle Laccase aus *B. licheniformis* kloniert, in *E. coli* überexprimiert und charakterisiert. Die Laccase CotA aus *B. licheniformis* katalysierte die oxidative Phenolkupplung von 5 mM Sinapinsäure, Kaffeesäure und Ferulasäure mit 66%, 22% bzw. 15% Umsatz nach 120 min und könnte somit ebenfalls zur Synthese von Naturstoffen eingesetzt werden. Die Aktivität von CotA gegenüber den Substraten war dabei von den substituierenden Gruppen in *ortho*-Position der Phenolgruppe und von der Alkylkettenlänge der Säureseitengruppe abhängig. Die Reaktionen waren nach 120 min allerdings noch nicht beendet. Ob eine vollständige Umsetzung dieser Substrate durch CotA möglich ist oder durch Produkthemmung verhindert wird, werden zukünftige Arbeiten zeigen. Die Aktivität von CotA gegenüber Sinapinsäure war im Vergleich zu den Laccasen aus *T. versicolor* relativ gering. Auch die Expression von

CotA in *E. coli* war mit 410 U l^{-1} volumetrischer Aktivität zu niedrig, um einen biotechnologischen Einsatz dieses Enzyms zu realisieren. Durch eine Kombination aus Zufalls- und ortsgerichteter Mutagenese wurde die Expression und Aktivität von CotA deutlich gesteigert. Die dabei erzeugte CotA-Variante K316N/D500G zeigte eine 11,4-fach höhere Expression als der Wildtyp. Aus 1 l Kultur von *E. coli*-Zellen können nun nahezu 300 mg aktive Laccase erhalten werden, was den Einsatz dieses Enzyms in der Biokatalyse realisierbar macht.

Ein großer Teil der exprimierten Laccase lag jedoch auch in inaktiver Form im Cytosol sowie in *inclusion bodies* vor. Vermutlich ist die Konzentration an freiem Kupfer im Cytosol zu gering, so dass das exprimierte Enzym nur ungenügend mit Kupfer beladen und deshalb teilweise nicht korrekt gefaltet werden kann. In *S. cerevisiae* wurde beispielsweise gezeigt, dass unter normalen Wachstumsbedingungen nur ein freies Kupferatom pro Zelle vorkommt (Rae et al. 1999). Da Kupfer toxisch für Zellen ist, liegt es in der Zelle nicht frei vor, sondern wird im Zellinneren an Proteine gebunden, um eine Schädigung des Organismus zu verhindern. Dadurch steht aber nur wenig Kupfer für den Einbau in Laccasen zur Verfügung. Durch Erhöhung der extrazellulären Kupferkonzentration konnte in dieser Arbeit die Menge an aktiv exprimierter Laccase deutlich gesteigert werden. Aufgrund der Toxizität von Kupfer kann aber nur eine begrenzte Menge zugesetzt werden. Die Kupferaufnahme und Kupferverteilung ist in prokaryotischen wie in eukaryotischen Zellen streng reguliert. Besonders gut untersucht sind die Kupfer-Homöostase-Systeme in *Enterococcus hirae* und *S. cerevisiae* (Labbe und Thiele 1999, Solioz und Stoyanov 2003). Dort wurden sogenannte Kupfer-Chaperone beschrieben, die Kupfer in die Zelle hinein sowie in bestimmte Zellkompartimente transportieren und somit genügend Kupfer für Kupfer-abhängige Enzyme verfügbar machen. Einige Kupfer-haltige Enzyme werden über spezielle Kupfer-Chaperone direkt mit Kupfer versorgt. So wird die Cu/Zn-Superoxiddismutase (SOD1) durch Interaktion mit Kupfergebundenem CCS (copper chaperone for SOD) mit Kupfer beladen (Culotta et al. 1997, Kim et al. 2008). In *Cryptococcus neoformans* wurde nachgewiesen, dass die Kupfer-abhängige P-Typ ATPase Ccc2 für die Kupferbeladung der Laccase LAC-1 benötigt wird (Kim et al. 2008). Durch Koexpression bakterieller Kupfer-Chaperone soll versucht werden, die Kupferbeladung von K316N/D500G zu verbessern und damit die Ausbeute an aktiver Laccase weiter zu erhöhen. Im Rahmen einer Diplomarbeit wird derzeit am Institut der Einfluss von potenziellen Kupfer-Chaperonen aus *B. licheniformis* auf die Expression von CotA in *E. coli* untersucht.

Die CotA-Variante K316N/D500G zeigte verglichen mit CotA-Wildtyp neben der verbesserten Expression auch eine um circa 50% gesteigerte spezifische Aktivität gegenüber Ferulasäure. Die spezifische Aktivität von K316N/D500G gegenüber Kaffeesäure war zudem leicht erhöht. Darüber hinaus wurden die Farbstoffe Alizarin Red S, Remazol Brilliant Blue R und Indigocarmin in Anwesenheit des Redoxmediators Violursäure innerhalb von 30 min von K316N/D500G bis zu 88% entfärbt, während die Entfärbung mit CotA-Wildtyp nur bei bis zu 75% lag. Durch die stark erhöhte Expression von K316N/D500G und die gesteigerte Aktivität gegenüber phenolischen Säuren wie auch Farbstoffen ist auch dieses Enzym potenziell für die Anwendung in der Biokatalyse geeignet. Somit konnte gezeigt werden, dass neben Laccasen aus Pilzen auch bakterielle Laccasen prinzipiell biotechnologisch einsetzbar sind.

Ein Sequenzvergleich verschiedener Laccasen aus Pilzen und Bakterien zeigte, dass an Position 500 von CotA in diesen Enzymen ein hoch konserviertes Glycin zu finden ist. Die Einführung der Mutation D500G erhöhte die Expression von CotA um einen Faktor von 7,8. Position 316 in CotA ist hingegen nicht konserviert. Der Einfluss dieser Position auf die Proteineigenschaften war aus der Struktur der Laccase nicht vorherzusehen, was die Bedeutung der Zufallsmutagenese für die Entwicklung von Biokatalysatoren mit verbesserten Eigenschaften verdeutlicht. Eine Sättigungsmutagenese an Position 316 von K316N/D500G wird zeigen, ob durch die Einführung anderer Aminosäuren als Lysin und Asparagin an dieser Position die Aktivität und Expression des Enzyms noch weiter gesteigert werden kann. Der strukturelle Einfluss der Mutation K316N auf die verbesserte Aktivität und Expression von K316N/D500G konnte bisher nicht geklärt werden. Kristallstrukturen von CotA-Wildtyp und K316N/D500G können Aufschluss darüber geben, ob und in welcher Weise die Mutationen K316N und D500G zu strukturellen Veränderungen der Laccase führen. Ferner können Kristallstrukturen von CotA-Wildtyp und K316N/D500G mit gebundenem Substrat dabei helfen, die Aktivität des Enzyms über rationales Protein-Design zu verbessern.

Durch Zufallsmutagenese des K316N/D500G-kodierenden Gens könnte die Expression, Aktivität sowie Stabilität von K316N/D500G noch weiter gesteigert werden. Eine bereits durchgeführte Zufallsmutagenese des K316N/D500G-kodierenden Gens sowie die anschließende Durchmusterung von 6000 erzeugten Klonen brachte bisher keine weitere Steigerung der Expression bzw. spezifischen Aktivität von K316N/D500G. Die Mutationsrate mit bis zu drei Aminosäureaustauschen pro Enzym war vermutlich zu hoch und führte zur Inaktivierung oder Verminderung der Aktivität der erzeugten K316N/D500G-Varianten. Dies spiegelte sich auch in dem relativ hohen Anteil inaktiver Klone von circa 60% wider. Eine deutlich

geringere Mutationsrate bei der Zufallsmutagenese wird die hohe Inaktivierungsrate von K316N/D500G-Varianten vermutlich verhindern.

Wie bereits dargestellt wurde, können durch den kombinierten Einsatz von Laccasen und dirigierenden Proteinen Naturstoffe wie Lignane stereoselektiv synthetisiert werden. Dieses Ziel wird im Rahmen des SFB 706-B4-Projektes verfolgt. In der vorliegenden Arbeit wurde bereits gezeigt, dass die Laccasen aus *T. versicolor* und *B. licheniformis* die oxidative Kupplung phenolischer Säuren zum Teil mit hoher Regioselektivität katalysieren. Am Institut für Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen der Universität Hohenheim wurde im Rahmen dieses Projektes ein dirigierendes Protein aus *Arabidopsis thaliana* sowie aus *Forsythia intermedia* kloniert und exprimiert. Der Einfluss dieser Proteine auf die Regio- und Stereoselektivität der oxidativen Kupplung phenolischer Verbindungen wie *E*-Koniferylalkohol durch die in dieser Arbeit hergestellten Laccasen wird derzeit vom Projektpartner untersucht.

5. Literaturverzeichnis

- Adler, E. 1977. Lignin chemistry - past, present and future. *Wood Science and Technology* 11: 169-218.
- Alcalde, M., T. Bulter, M. Zumarraga, H. Garcia-Arellano, M. Mencia, F. J. Plou, and A. Ballesteros. 2005. Screening mutant libraries of fungal laccases in the presence of organic solvents. *Journal of Biomolecular Screening* 10: 624-631.
- Alcalde, M., M. Zumarraga, J. Polaina, A. Ballesteros, and F. J. Plou. 2006. Combinatorial saturation mutagenesis by in vivo overlap extension for the engineering of fungal laccases. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 9: 719-727.
- Arakane, Y., S. Muthukrishnan, R. W. Beeman, M. R. Kanost, and K. J. Kramer. 2005. Laccase 2 is the phenoloxidase gene required for beetle cuticle tanning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 11337-11342.
- Arias, M. E., M. Arenas, J. Rodriguez, J. Soliveri, A. S. Ball, and M. Hernandez. 2003. Kraft pulp biobleaching and mediated oxidation of a nonphenolic substrate by laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 1953-1958.
- Baldrian, P. 2006. Fungal laccases - occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews* 30: 215-242.
- Bertrand, T., C. Jolival, P. Briozzo, E. Caminade, N. Joly, C. Madzak, and C. Mougin. 2002. Crystal structure of a four-copper laccase complexed with an arylamine: Insights into substrate recognition and correlation with kinetics. *Biochemistry* 41: 7325-7333.
- Bohlin, C., L. J. Jonsson, R. Roth, and W. H. van Zyl. 2006. Heterologous expression of *Trametes versicolor* laccase in *Pichia pastoris* and *Aspergillus niger*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 129-132: 195-214.
- Bourbonnais, R., D. Leech, and M. G. Paice. 1998. Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* 1379: 381-390.

- Bourbonnais, R., and M. G. Paice. 1990. Oxidation of nonphenolic substrates - an expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Letters* 267: 99-102.
- Bourbonnais, R., M. G. Paice, I. D. Reid, P. Lanthier, and M. Yaguchi. 1995. Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1876-1880.
- Bradford, M. M. 1976. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Braun, S., and S. E. Vecht-Lifshitz. 1991. Mycelial morphology and metabolite production. *Trends in Biotechnology* 9: 63-68.
- Bulter, T., M. Alcalde, V. Sieber, P. Meinhold, C. Schlachtbauer, and F. H. Arnold. 2003a. Functional expression of a fungal laccase in *Saccharomyces cerevisiae* by directed evolution. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 987-995.
- Bulter, T., V. Sieber, and M. Alcalde. 2003b. Screening mutant libraries in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in Molecular Biology* 230: 99-107.
- Call, H. P. 1992. Process, using enhanced-action laccase enzymes, for the delignification or bleaching of lignocellulose-containing material or for the treatment of waste water. *WO/1992/020857*.
- Cambria, M. T., Z. Minniti, V. Librando, and A. Cambria. 2008. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Rigidoporus lignosus* and its laccase in the presence of redox mediators. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 149: 1-8.
- Cantarella, G., C. Galli, and P. Gentili. 2003. Free radical versus electron-transfer routes of oxidation of hydrocarbons by laccase/mediator systems catalytic or stoichiometric procedures. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 22: 135-144.
- Cassland, P., and L. J. Jonsson. 1999. Characterization of a gene encoding *Trametes versicolor* laccase A and improved heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* by decreased cultivation temperature. *Applied Microbiology and Biotechnology* 52: 393-400.
- Cereghino, J. L., and J. M. Cregg. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews* 24: 45-66.

- Chefetz, B., Y. Chen, and Y. Hadar. 1998. Purification and characterization of laccase from *Chaetomium thermophilum* and its role in humification. *Applied Environmental Microbiology* 64: 3175-3179.
- Chhabra, M., S. Mishra, and T. R. Sreekrishnan. 2008. Mediator-assisted decolorization and detoxification of textile dyes/dye mixture by *Cyathus bulleri* laccase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*; noch nicht gedruckt, nur elektronisch veröffentlicht.
- Claus, H. 2003. Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Archives of Microbiology* 179: 145-150.
- Claus, H. 2004. Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron* 35: 93-96.
- Clutterbuck, A. J. 1972. Absence of laccase from yellow-spored mutants of *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology* 70: 423-435.
- Colao, M. C., S. Lupino, A. M. Garzillo, V. Buonocore, and M. Ruzzi. 2006. Heterologous expression of *lccI* gene from *Trametes trogii* in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. *Microbial Cell Factories* 5: 31.
- Collins, P. J., and A. Dobson. 1997. Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Applied Environmental Microbiology* 63: 3444-3450.
- Collins, P. J., M. Kotterman, J. A. Field, and A. Dobson. 1996. Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by laccases from *Trametes versicolor*. *Applied Environmental Microbiology* 62: 4563-4567.
- Cordell, G. A., and N. R. Farnsworth. 1977. Experimental antitumor agents from plants, 1974-76. *Lloydia* 40: 1-44.
- Couto, S. R., and J. L. Toca-Herrera. 2007. Laccase production at reactor scale by filamentous fungi. *Biotechnology Advances* 25: 558-569.
- Culotta, V. C., L. W. Klomp, J. Strain, R. L. Casareno, B. Krems, and J. D. Gitlin. 1997. The copper chaperone for superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry* 272: 23469-23472.
- Davin, L. B., H. B. Wang, A. L. Crowell, D. L. Bedgar, D. M. Martin, S. Sarkanen, and N. G. Lewis. 1997. Stereoselective bimolecular phenoxy radical coupling by an auxiliary (dirigent) protein without an active center. *Science* 275: 362-366.

- Diamantidis, G., A. Effosse, P. Potier, and R. Bally. 2000. Purification and characterization of the first bacterial laccase in the rhizospheric bacterium *Azospirillum lipoferum*. *Soil Biology & Biochemistry* 32: 919-927.
- Dittmer, N. T., R. J. Suderman, H. Jiang, Y. C. Zhu, M. J. Gorman, K. J. Kramer, and M. R. Kanost. 2004. Characterization of cDNAs encoding putative laccase-like multicopper oxidases and developmental expression in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34: 29-41.
- Durao, P., I. Bento, A. T. Fernandes, E. P. Melo, P. F. Lindley, and L. O. Martins. 2006. Perturbations of the T1 copper site in the CotA laccase from *Bacillus subtilis*: structural, biochemical, enzymatic and stability studies. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 11: 514-526.
- Durao, P., Z. Chen, C. S. Silva, C. M. Soares, M. M. Pereira, S. Todorovic, P. Hildebrandt, I. Bento, P. F. Lindley, and L. O. Martins. 2008. Proximal mutations at the type 1 copper site of CotA laccase: spectroscopic, redox, kinetic and structural characterization of I494A and L386A mutants. *Biochemical Journal* 412: 339-346.
- Eggert, C. 1997. Laccase-catalyzed formation of cinnabarinic acid is responsible for antibacterial activity of *Pycnoporus cinnabarinus*. *Microbiological Research* 152: 315-318.
- ElKaoutit, M., I. Naranjo-Rodriguez, K. R. Tamsamani, M. P. Hernandez-Artiga, D. Bellido-Milla, and J. L. H. H. de Cisneros. 2008. A comparison of three amperometric phenoloxidase-Sonogel-Carbon based biosensors for determination of polyphenols in beers. *Food Chemistry* 110: 1019-1024.
- Endo, K., Y. Hayashi, T. Hibi, K. Hosono, T. Beppu, and K. Ueda. 2003. Enzymological characterization of EpoA, a laccase-like phenol oxidase produced by *Streptomyces griseus*. *Journal of Biochemistry* 133: 671-677.
- Enguita, F. J., L. O. Martins, A. O. Henriques, and M. A. Carrondo. 2003. Crystal structure of a bacterial endospore coat component. A laccase with enhanced thermostability properties. *Journal of Biological Chemistry* 278: 19416-19425.
- Erdtman, H. 1933. Dehydration in the coniferyl series. (I). Dehydrodi-eugenol and dehydrodi-iso-eugenol. *Biochemische Zeitschrift* 258: 172-180.

- Fabbrini, M., C. Galli, and P. Gentili. 2002. Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 16: 231-240.
- Faraco, V., C. Ercole, G. Festa, P. Giardina, A. Piscitelli, and G. Sannia. 2008. Heterologous expression of heterodimeric laccase from *Pleurotus ostreatus* in *Kluyveromyces lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 77: 1329-1335.
- Ferrara, M. A., N. M. B. Severino, J. J. Mansure, A. S. Martins, E. M. M. Oliveira, A. C. Siani, N. Pereira, F. A. G. Torres, and E. P. S. Bon. 2006. Asparaginase production by a recombinant *Pichia pastoris* strain harbouring *Saccharomyces cerevisiae* ASP3 gene. *Enzyme and Microbial Technology* 39: 1457-1463.
- Festa, G., F. Autore, F. Fraternali, P. Giardina, and G. Sannia. 2008. Development of new laccases by directed evolution: functional and computational analyses. *Proteins* 72: 25-34.
- Frandsen, R. J., N. J. Nielsen, N. Maolanon, J. C. Sorensen, S. Olsson, J. Nielsen, and H. Giese. 2006. The biosynthetic pathway for aurofusarin in *Fusarium graminearum* reveals a close link between the naphthoquinones and naphthopyrones. *Molecular Microbiology* 61: 1069-1080.
- Fujii, I., H. Iijima, S. Tsukita, Y. Ebizuka, and U. Sankawa. 1987. Purification and properties of dihydrogeodin oxidase from *Aspergillus terreus*. *Journal of Biochemistry* 101: 11-18.
- Galhaup, C., H. Wagner, B. Hinterstoisser, and D. Haltrich. 2002. Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. *Enzyme and Microbial Technology* 30: 529-536.
- Geiger, J. P., M. Nicole, D. Nandris, and B. Rio. 1986. Root-rot diseases of *Hevea brasiliensis*.1. Physiological and biochemical aspects of host aggression. *European Journal of Forest Pathology* 16: 22-37.
- Gianfreda, L., F. Xu, and J. M. Bollag. 1999. Laccases: A useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation Journal* 3: 1-25.
- Givaudan, A., A. Effosse, D. Faure, P. Potier, M. L. Bouillant, and R. Bally. 1993. Polyphenol oxidase in *Azospirillum lipoferum* isolated from rice rhizosphere: Evidence for laccase activity in non-motile strains of *Azospirillum lipoferum* *FEMS Microbiology Letters* 108: 205-210.

- Gouka, R. J., M. van der Heiden, T. Swarthoff, and C. T. Verrips. 2001. Cloning of a phenol oxidase gene from *Acremonium murorum* and its expression in *Aspergillus awamori*. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2610-2616.
- Grass, G., and C. Rensing. 2001. CueO is a multi-copper oxidase that confers copper tolerance in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 286: 902-908.
- Grass, G., K. Thakali, P. E. Klebba, D. Thieme, A. Muller, G. F. Wildner, and C. Rensing. 2004. Linkage between catecholate siderophores and the multicopper oxidase CueO in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 186: 5826-5833.
- Guo, M., F. P. Lu, J. Pu, D. Q. Bai, and L. X. Du. 2005. Molecular cloning of the cDNA encoding laccase from *Trametes versicolor* and heterologous expression in *Pichia methanolica*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 69: 178-183.
- Han, M. J., H. T. Choi, and H. G. Song. 2004. Degradation of phenanthrene by *Trametes versicolor* and its laccase. *Journal of Microbiology* 42: 94-98.
- Harkin, J. M., and J. R. Obst. 1973. Syringaldazine, an effective reagent for detecting laccase and peroxidase in fungi. *Experientia* 29: 382-387.
- Hoegger, P. J., S. Kilaru, T. Y. James, J. R. Thacker, and U. Kues. 2006. Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. *FEBS Journal* 273: 2308-2326.
- Hong, Y., Y. Xiao, H. Zhou, W. Fang, M. Zhang, J. Wang, L. Wu, and Z. Yu. 2006. Expression of a laccase cDNA from *Trametes* sp. AH28-2 in *Pichia pastoris* and mutagenesis of transformants by nitrogen ion implantation. *FEMS Microbiology Letters* 258: 96-101.
- Hoshida, H., T. Fujita, K. Murata, K. Kubo, and R. Akada. 2005. Copper-dependent production of a *Pycnoporus coccineus* extracellular laccase in *Aspergillus oryzae* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 69: 1090-1097.
- Hu, M. R., Y. P. Chao, G. Q. Zhang, X. Q. Yang, Z. Q. Xue, and S. J. Qian. 2007. Molecular evolution of *Fome lignosus* laccase by ethyl methane sulfonate-based random mutagenesis in vitro. *Biomolecular Engineering* 24: 619-624.

- Hullo, M. F., I. Moszer, A. Danchin, and I. Martin-Verstraete. 2001. CotA of *Bacillus subtilis* is a copper-dependent laccase. *Journal of Bacteriology* 183: 5426-5430.
- Huttermann, A., C. Mai, and A. Kharazipour. 2001. Modification of lignin for the production of new compounded materials. *Applied Microbiology and Biotechnology* 55: 387-394.
- Inoue, T., M. Gotowda, H. Sugawara, T. Kohzuma, F. Yoshizaki, Y. Sugimura, and Y. Kai. 1999. Structure comparison between oxidized and reduced plastocyanin from a fern, *Dryopteris crassirhizoma*. *Biochemistry* 38: 13853-13861.
- Johannes, C., and A. Majcherczyk. 2000. Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 524-528.
- Johannes, C., A. Majcherczyk, and A. Huttermann. 1996. Degradation of anthracene by laccase of *Trametes versicolor* in the presence of different mediator compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology* 46: 313-317.
- Johannes, C., A. Majcherczyk, and A. Huttermann. 1998. Oxidation of acenaphthene and acenaphthylene by laccase of *Trametes versicolor* in a laccase-mediator system. *Journal of Biotechnology* 61: 151-156.
- Jolival, C., C. Madzak, A. Brault, E. Caminade, C. Malosse, and C. Mougin. 2005. Expression of laccase IIIb from the white-rot fungus *Trametes versicolor* in the yeast *Yarrowia lipolytica* for environmental applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 66: 450-456.
- Jonsson, L. J., M. Saloheimo, and M. Penttila. 1997. Laccase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*: cDNA cloning of *Icc1* and expression in *Pichia pastoris*. *Current Genetics* 32: 425-430.
- Kiiskinen, L. L., K. Kruus, M. Bailey, E. Ylosmaki, M. Siika-aho, and M. Saloheimo. 2004. Expression of *Melanocarpus albomyces* laccase in *Trichoderma reesei* and characterization of the purified enzyme. *Microbiology* 150: 3065-3074.
- Kiiskinen, L. L., L. Viikari, and K. Kruus. 2002. Purification and characterisation of a novel laccase from the ascomycete *Melanocarpus albomyces*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59: 198-204.
- Kim, B. E., T. Nevitt, and D. J. Thiele. 2008. Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. *Nature Chemical Biology* 4: 176-85.

- Kim, J. E., K. H. Han, H. M. Jin, H. Kim, J. C. Kim, S. H. Yun, and Y. W. Lee. 2005. Putative polyketide synthase and laccase genes for biosynthesis of aurofusarin in *Gibberella zeae*. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 1701-1708.
- Kita, Y., M. Arisawa, M. Gyoten, M. Nakajima, R. Hamada, H. Tohma, and T. Takada. 1998. Oxidative intramolecular phenolic coupling reaction induced by a hypervalent iodine(III) reagent: Leading to galanthamine-type amaryllidaceae alkaloids. *Journal of Organic Chemistry* 63: 6625-6633.
- Koschorreck, K., S. M. Richter, A. B. Ene, E. Roduner, R. D. Schmid, and V. B. Urlacher. 2008a. Cloning and characterization of a new laccase from *Bacillus licheniformis* catalyzing dimerization of phenolic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology* 79: 217-224.
- Koschorreck, K., S. M. Richter, A. Swierczek, U. Beifuss, R. D. Schmid, and V. B. Urlacher. 2008b. Comparative characterization of four laccases from *Trametes versicolor* concerning phenolic C-C coupling and oxidation of PAHs. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 474: 213-219.
- Kurtz, M. B., and S. P. Champe. 1982. Purification and characterization of the conidial laccase of *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology* 151: 1338-1345.
- Labbe, S., and D. J. Thiele. 1999. Pipes and wiring: the regulation of copper uptake and distribution in yeast. *Trends in Microbiology* 7: 500-505.
- Lacki, K., and Z. Duvnjak. 1996. Transformation of 3,5-dimethoxy-4-hydroxy cinnamic acid and its derivatives using enzyme from white-rot fungus *Trametes versicolor*: Enzyme characteristics and its application. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 65: 211-220.
- Lacki, K., and Z. Duvnjak. 1998. Transformation of 3,5-dimethoxy,4-hydroxy cinnamic acid by polyphenol oxidase from the fungus *Trametes versicolor*: Product elucidation studies. *Biotechnology and Bioengineering* 57: 694-703.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Larrondo, L. F., M. Avila, L. Salas, D. Cullen, and R. Vicuna. 2003. Heterologous expression of laccase cDNA from *Ceriporiopsis subvermispora* yields copper-activated apoprotein and complex isoform patterns. *Microbiology* 149: 1177-1182.

- Larsson, S., P. Cassland, and L. J. Jonsson. 2001. Development of a *Saccharomyces cerevisiae* strain with enhanced resistance to phenolic fermentation inhibitors in lignocellulose hydrolysates by heterologous expression of laccase. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 1163-1170.
- Leatham, G. F., and M. A. Stahmann. 1981. Studies on the laccase of *Lentinus edodes*: Specificity, localization and association with the development of fruiting bodies. *Journal of General Microbiology* 125: 147-157.
- Leonowicz, A., R. U. Edgehill, and J. M. Bollag. 1984. The effect of pH on the transformation of syringic and vanillic acids by the laccases of *Rhizoctonia praticola* and *Trametes versicolor*. *Archives of Microbiology* 137: 89-96.
- Leutbecher, H., J. Conrad, I. Klaiber, and U. Beifuss. 2005. O-heterocycles via laccase-catalyzed domino reactions with O₂ as the oxidant. *Synlett* 20: 3126-3130.
- Li, K. C., F. Xu, and K. E. L. Eriksson. 1999. Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2654-2660.
- Li, X., Z. Y. Wei, M. Zhang, X. H. Peng, G. Z. Yu, M. K. Teng, and W. M. Gong. 2007. Crystal structures of *E. coli* laccase CueO at different copper concentrations. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 354: 21-26.
- Liu, J., R. D. Stipanovic, A. A. Bell, L. S. Puckhaber, and C. W. Magill. 2008. Stereoselective coupling of hemigossypol to form (+)-gossypol in moco cotton is mediated by a dirigent protein. *Phytochemistry*; noch nicht gedruckt, nur elektronisch veröffentlicht.
- Lomascolo, A., E. Record, I. Herpoel-Gimbert, M. Delattre, J. L. Robert, J. Georis, T. Dauvrin, J. C. Sigoillot, and M. Asther. 2003. Overproduction of laccase by a monokaryotic strain of *Pycnoporus cinnabarinus* using ethanol as inducer. *Journal of Applied Microbiology* 94: 618-624.
- Machczynski, M. C., E. Vijgenboom, B. Samyn, and G. W. Canters. 2004. Characterization of SLAC: a small laccase from *Streptomyces coelicolor* with unprecedented activity. *Protein Science* 13: 2388-2397.
- MacRae, W. D., J. B. Hudson, and G. H. Towers. 1989. The antiviral action of lignans. *Planta Medica* 55: 531-535.

- Madzak, C., C. Jolival, M. C. Mimmi, A. Brault, E. Caminade, C. Mougin, and J. M. Beckerich. 2005a. *Yarrowia lipolytica*, a yeast expression system adapted to the genetic engineering of complex proteins: directed mutagenesis of a fungal laccase. *FEBS Journal* 272: 513-514.
- Madzak, C., M. C. Mimmi, E. Caminade, A. Brault, S. Baumberger, P. Briozzo, C. Mougin, and C. Jolival. 2006. Shifting the optimal pH of activity for a laccase from the fungus *Trametes versicolor* by structure-based mutagenesis. *Protein Engineering Design & Selection* 19: 77-84.
- Madzak, C., L. Otterbein, M. Chamkha, S. Moukha, M. Asther, C. Gaillardin, and J. M. Beckerich. 2005b. Heterologous production of a laccase from the basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus* in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Research* 5: 635-546.
- Majcherzyk, A., C. Johannes, and A. Huttermann. 1998. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by laccase of *Trametes versicolor*. *Enzyme and Microbial Technology* 22: 335-341.
- Marjasvaara, A., M. Torvinen, and P. Vainiotalo. 2004. Laccase-catalyzed mediated oxidation of benzyl alcohol: the role of TEMPO and formation of products including benzonitrile studied by nanoelectrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 39: 1139-1146.
- Martins, L. O., C. M. Soares, M. M. Pereira, M. Teixeira, T. Costa, G. H. Jones, and A. O. Henriques. 2002. Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat. *Journal of Biological Chemistry* 277: 18849-18859.
- Mayer, A. M., and R. C. Staples. 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* 60: 551-565.
- Melo, E. P., A. T. Fernandes, P. Durao, and L. O. Martins. 2007. Insight into stability of CotA laccase from the spore coat of *Bacillus subtilis*. *Biochemical Society Transactions* 35: 1579-1582.
- Messerschmidt, A., and R. Huber. 1990. The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin - modeling and structural relationships. *European Journal of Biochemistry* 187: 341-352.

- Messerschmidt, A., R. Ladenstein, R. Huber, M. Bolognesi, L. Avigliano, R. Petruzzelli, A. Rossi, and A. Finazziagro. 1992. Refined crystal-structure of ascorbate oxidase at 1.9 Å resolution. *Journal of Molecular Biology* 224: 179-205.
- Mikuni, J., and N. Morohoshi. 1997. Cloning and sequencing of a second laccase gene from the white-rot fungus *Coriolus versicolor*. *FEMS Microbiology Letters* 155: 79-84.
- Miyazaki, K. 2005. A hyperthermophilic laccase from *Thermus thermophilus* HB27. *Extremophiles* 9: 415-425.
- Morozova, O. V., G. P. Shumakovich, S. V. Shleev, and Y. I. Yaropolov. 2007. Laccase-mediator systems and their applications: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology* 43: 523-535.
- Moss, G. P. 2000. Nomenclature of lignans and neolignans (IUPAC Recommendations 2000). *Pure and Applied Chemistry* 72: 1493-1523.
- Mustafa, R., L. Muniglia, B. Rovel, and M. Girardin. 2005. Phenolic colorants obtained by enzymatic synthesis using a fungal laccase in a hydro-organic biphasic system. *Food Research International* 38: 995-1000.
- Necochea, R., B. Valderrama, S. Diaz-Sandoval, J. L. Folch-Mallol, R. Vazquez-Duhalt, and G. Iturriaga. 2005. Phylogenetic and biochemical characterisation of a recombinant laccase from *Trametes versicolor*. *FEMS Microbiology Letters* 244: 235-241.
- Nose, M., M. A. Bernards, M. Furlan, J. Zajicek, T. L. Eberhardt, and N. G. Lewis. 1995. Towards the specification of consecutive steps in macromolecular lignin assembly. *Phytochemistry* 39: 71-79.
- O'Callaghan, J., M. M. O'Brien, K. McClean, and A. D. W. Dobson. 2002. Optimisation of the expression of a *Trametes versicolor* laccase gene in *Pichia pastoris*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 29: 55-59.
- Omalley, D. M., R. Whetten, W. L. Bao, C. L. Chen, and R. R. Sederoff. 1993. The role of laccase in lignification. *Plant Journal* 4: 751-757.
- Palmer, A. E., D. W. Randall, F. Xu, and E. I. Solomon. 1999. Spectroscopic studies and electronic structure description of the high potential type 1 copper site in fungal laccase: Insight into the effect of the axial ligand. *Journal of the American Chemical Society* 121: 7138-7149.

- Palmer, A. E., R. K. Szilagyi, J. R. Cherry, A. Jones, F. Xu, and E. I. Solomon. 2003. Spectroscopic characterization of the Leu513His variant of fungal laccase: effect of increased axial ligand interaction on the geometric and electronic structure of the type 1 Cu site. *Inorganic Chemistry* 42: 4006-4017.
- Palmieri, G., P. Giardina, C. Bianco, B. Fontanella, and G. Sannia. 2000. Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 920-924.
- Pati, S., I. Losito, F. Palmisano, and P. G. Zambonin. 2006. Characterization of caffeic acid enzymatic oxidation by-products by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1102: 184-192.
- Piontek, K., M. Antorini, and T. Choinowski. 2002. Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-angstrom resolution containing a full complement of coppers. *Journal of Biological Chemistry* 277: 37663-37669.
- Piscitelli, A., P. Giardina, C. Mazzoni, and G. Sannia. 2005. Recombinant expression of *Pleurotus ostreatus* laccases in *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 69: 428-439.
- Potthast, A., T. Rosenau, C. L. Chen, and J. S. Gratzl. 1995. Selective enzymatic oxidation of aromatic methyl-groups to aldehydes. *Journal of Organic Chemistry* 60: 4320-4321.
- Pummerer, R., H. Puttfarcken, and P. Schopflocher. 1925. Dehydration of rho-cresol. (VIII. announcement on the oxidation of phenoles.). *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* 58: 1808-1820.
- Rae, T. D., P. J. Schmidt, R. A. Pufahl, V. C. Culotta, and T. V. O'Halloran. 1999. Undetectable intracellular free copper: The requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science* 284: 805-808.
- Reinhammar, B., and B. G. Malstrom. 1981. Blue copper-containing oxidases, In Lontie L (ed.). *Copper proteins and copper enzymes*. CRC Press Inc., Boca Raton, Fla.: 1-35.
- Roberts, S. A., A. Weichsel, G. Grass, K. Thakali, J. T. Hazzard, G. Tollin, C. Rensing, and W. R. Montfort. 2002. Crystal structure and electron transfer kinetics of CueO, a multicopper oxidase required for copper homeostasis in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 2766-2771.

- Roberts, S. A., G. F. Wildner, G. Grass, A. Weichsel, A. Ambrus, C. Rensing, and W. R. Montfort. 2003. A labile regulatory copper ion lies near the T1 copper site in the multicopper oxidase CueO. *Journal of Biological Chemistry* 278: 31958-31963.
- Rodriguez Couto, S., M. Sanroman, and G. M. Gubitz. 2005. Influence of redox mediators and metal ions on synthetic acid dye decolourization by crude laccase from *Trametes hirsuta*. *Chemosphere* 58: 417-422.
- Ruijsenaars, H. J., and S. Hartmans. 2004. A cloned *Bacillus halodurans* multicopper oxidase exhibiting alkaline laccase activity. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65: 177-182.
- Sagner, S., Z. W. Shen, B. Deus-Neumann, and M. H. Zenk. 1998. The biosynthesis of lunarine in seeds of *Lunaria annua*. *Phytochemistry* 47: 375-387.
- Saloheimo, M., and M. L. Nikupaavola. 1991. Heterologous production of a ligninolytic enzyme - expression of the *Phlebia radiata* laccase gene in *Trichoderma reesei*. *Biotechnology* 9: 987-990.
- Scheel, T., U. Holker, S. Ludwig, and M. Hofer. 1999. Evidence for and expression of a laccase gene in three basidiomycetes degrading humic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology* 52: 66-69.
- Schouten, A., O. Maksimova, Y. Cuesta-Arenas, G. van den Berg, and J. M. Raaijmakers. 2008. Involvement of the ABC transporter BcAtrB and the laccase BcLCC2 in defence of *Botrytis cinerea* against the broad-spectrum antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol. *Environmental Microbiology* 10: 1145-1157.
- Schouten, A., L. Wagemakers, F. L. Stefanato, R. M. van der Kaaij, and J. A. van Kan. 2002. Resveratrol acts as a natural profungicide and induces self-intoxication by a specific laccase. *Molecular Microbiology* 43: 883-94.
- Sharma, R., R. Goel, and N. Capalash. 2007. Bacterial laccases. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23: 823-832.
- Singh, S. K., G. Grass, C. Rensing, and W. R. Montfort. 2004. Cuprous oxidase activity of CueO from *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 186: 7815-7817.
- Soares, G. M. B., M. T. P. de Amorim, and M. Costa-Ferreira. 2001. Use of laccase together with redox mediators to decolourize Remazol Brilliant Blue R. *Journal of Biotechnology* 89: 123-129.

- Soden, D. M., J. O'Callaghan, and A. D. W. Dobson. 2002. Molecular cloning of a laccase isozyme gene from *Pleurotus sajor-caju* and expression in the heterologous *Pichia pastoris* host. *Microbiology* 148: 4003-4014.
- Solioz, M., and J. V. Stoyanov. 2003. Copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. *FEMS Microbiology Reviews* 27: 183-195.
- Solomon, E. I., P. Chen, M. Metz, S. K. Lee, and A. E. Palmer. 2001. Oxygen binding, activation, and reduction to water by copper proteins. *Angewandte Chemie-International Edition* 40: 4570-4590.
- Solomon, E. I., U. M. Sundaram, and T. E. Machonkin. 1996. Multicopper oxidases and oxygenases. *Chemical Reviews* 96: 2563-2606.
- Stegmann, E., S. Pelzer, D. Bischoff, O. Puk, S. Stockert, D. Butz, K. Zerbe, J. Robinson, R. D. Sussmuth, and W. Wohlleben. 2006. Genetic analysis of the balhimycin (vancomycin-type) oxygenase genes. *Journal of Biotechnology* 124: 640-653.
- Studier, F. W., and B. A. Moffatt. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology* 189: 113-130.
- Suderman, R. J., N. T. Dittmer, M. R. Kanost, and K. J. Kramer. 2006. Model reactions for insect cuticle sclerotization: Cross-linking of recombinant cuticular proteins upon their laccase-catalyzed oxidative conjugation with catechols. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 36: 353-365.
- Sugumaran, M., L. Giglio, H. Kundzicz, S. Saul, and V. Semensi. 1992. Studies on the enzymes involved in puparial cuticle sclerotization in *Drosophila melanogaster*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 19: 271-283.
- Suzuki, T., K. Endo, M. Ito, H. Tsujibo, K. Miyamoto, and Y. Inamori. 2003. A thermostable laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: purification, characterization, nucleotide sequence, and expression. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 67: 2167-2175.
- Takahama, U. 1995. Oxidation of hydroxycinnamic acid and hydroxycinnamyl alcohol derivatives by laccase and peroxidase - interactions among *p*-hydroxyphenyl, guaiacyl and syringyl groups during the oxidation reactions. *Physiologia Plantarum* 93: 61-68.

- Tang, L., G. M. Zeng, J. X. Liu, X. M. Xu, Y. Zhang, G. L. Shen, Y. P. Li, and C. Liu. 2008. Catechol determination in compost bioremediation using a laccase sensor and artificial neural networks. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391: 679-685.
- Thurston, C. F. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology-UK* 140: 19-26.
- Torrecilla, J. S., M. L. Mena, P. Yanez-Sedeno, and J. Garcia. 2008. Field determination of phenolic compounds in olive oil mill wastewater by artificial neural network. *Biochemical Engineering Journal* 38: 171-179.
- Whiting, D. A. 1991. Oxidative coupling of phenols and phenol ethers. In Trost BM (ed.). *Comprehensive organic synthesis: selectivity, strategy, and efficiency in modern organic chemistry. Carbon-carbon s-bond formation* Pergamon Press, New York: 659-703.
- Wirth, T. 2003. Hypervalent iodine chemistry - Modern developments in organic synthesis - Introduction and general aspects. *Hypervalent Iodine Chemistry: Modern Developments in Organic Synthesis* 224: 1-4.
- Wirth, T. 2005. Hypervalent iodine chemistry in synthesis: Scope and new directions. *Angewandte Chemie-International Edition* 44: 3656-3665.
- Woithe, K., N. Geib, K. Zerbe, D. B. Li, M. Heck, S. Fournier-Rousset, O. Meyer, F. Vitali, N. Matoba, K. Abou-Hadeed, and J. A. Robinson. 2007. Oxidative phenol coupling reactions catalyzed by OxyB: a cytochrome P450 from the vancomycin producing organism. Implications for vancomycin biosynthesis. *Journal of American Chemical Society* 129: 6887-6895.
- Wong, Y. X., and J. Yu. 1999. Laccase-catalyzed decolorization of synthetic dyes. *Water Research* 33: 3512-3520.
- Xu, F. 1996. Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: Correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. *Biochemistry* 35: 7608 -7614.
- Xu, F. 1997. Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases. *Journal of Biological Chemistry* 272: 924-928.

- Xu, F., R. M. Berka, J. A. Wahleithner, B. A. Nelson, J. R. Shuster, S. H. Brown, A. E. Palmer, and E. I. Solomon. 1998. Site-directed mutations in fungal laccase: effect on redox potential, activity and pH profile. *Biochemical Journal* 334: 63-70.
- Xu, F., T. Damhus, S. Danielsen, and L. H. Ostergaard. 2007. Catalytic applications of laccase. In Schmid RD, Urlacher VB (eds.). *Modern Biooxidation* Wiley-VCH, Weinheim: 43-75.
- Xu, F., A. E. Palmer, D. S. Yaver, R. M. Berka, G. A. Gambetta, S. H. Brown, and E. I. Solomon. 1999. Targeted mutations in a *Trametes villosa* laccase - Axial perturbations of the T1 copper. *Journal of Biological Chemistry* 274: 12372-12375.
- Xu, F., W. S. Shin, S. H. Brown, J. A. Wahleithner, U. M. Sundaram, and E. I. Solomon. 1996. A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability. *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1292: 303-311.
- Yamamura, S. 2003. Oxidation of phenols. In Rappoport Z. (ed.). *The chemistry of phenols* John Wiley & Sons, New York: 1107-1346.
- Yaver, D. S., F. Xu, E. J. Golightly, K. M. Brown, S. H. Brown, M. W. Rey, P. Schneider, T. Halkier, K. Mondorf, and H. Dalboge. 1996. Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 834-841.
- Yoshida, H. 1883. Chemistry of lacquer (Urushi). *Journal of the Chemical Society, Transactions* 43: 472-486.
- Youn, H. D., Y. C. Hah, and S. O. Kang. 1995. Role of laccase in lignin degradation by white-rot fungi. *FEMS Microbiology Letters* 132: 183-188.
- Zaitseva, I., V. Zaitsev, G. Card, K. Moshkov, B. Bax, A. Ralph, and P. Lindley. 1996. The X-ray structure of human serum ceruloplasmin at 3.1 angstrom: Nature of the copper centres. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 1: 15-23.
- Zenk, M. H., R. Gerardy, and R. Stadler. 1989. Phenol oxidative coupling of benzyloquinoline alkaloids is catalyzed by regio-selective and stereo-selective cytochrome-P-450 linked plant enzymes - salutaridine and berbaminine. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications* 22: 1725-1727.

Zumarraga, M., T. Bulter, S. Shleev, J. Polaina, A. Martinez-Arias, F. J. Plow, A. Ballesteros, and M. Alcalde. 2007. In vitro evolution of a fungal laccase in high concentrations of organic cosolvents. *Chemistry & Biology* 14: 1052-1064.

Zumarraga, M., S. Camarero, S. Shleev, A. Martinez-Arias, A. Ballesteros, F. J. Plou, and M. Alcalde. 2008. Altering the laccase functionality by in vivo assembly of mutant libraries with different mutational spectra. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* 71: 250-260.